

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DES INHIBITORS AUS SCHWEINESPERMA**

Gottfried Müller-Bardorff

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE UND
KLINISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle)

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES INHIBITORS
AUS SCHWEINESPERMA

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

Gottfried Müller-Bardorff

aus

München

M ü n c h e n 1 9 7 1

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:

Priv.-Doz.Dr.H.Fritz

Mitberichterstatter:



Prof.Dr.Dr.E.Werle

Dekan:

Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 19.12.1972

MEINEN ELTERN
UND
MEINER LIEBEN BRAUT

Herrn Prof.Dr.Dr.E.Werle und Herrn Priv.-Doz.
Dr.H.Fritz danke ich für die Überlassung des
Themas und für die wertvollen Hinweise und
Ratschläge.

Weiterhin danke ich Herrn Dr.E.Fink, der mir
stets bei der technischen Durchführung der
Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. E I N L E I T U N G	1
B. T H E O R E T I S C H E R T E I L	2
I. Literaturübersicht	2
II. Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung und Struktur der Inhibitoren	5
III. Wirkungsweise und Hemmtyp	5
IV. Modifizierung	6
V. Polyvalenz und Spezifität	7
VI. Reaktives Zentrum	8
VII. Physiologische Aufgaben der Inhibitoren	8
1. Pflanzliche Inhibitoren	9
2. Pankreas-Inhibitoren	9
3. Serum-Inhibitoren	9
4. Inhibitoren aus Vesiculardrüsen und Sperma	10
C. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N U N D E R G E B N I S S E	12
I. Untersuchungsmaterial	12
II. Isolierungsvorgang	12

1. Eiweißfällung und Konzentrierung	12
2. Adsorption und Desorption im Batch-Verfahren	12
3. Entsalzung durch Dialyse	13
4. Erste Gelfiltration und Gefriertrocknung	14
5. Affinitätschromatographie über Trypsinharz	14
6. Zweite Gelfiltration und Gefriertrocknung	17
 III. Charakterisierung	 17
1. Hemmverhalten und Hemmtyp	17
a) Trypsin und Plasmin	17
b) Chymotrypsin	19
c) Kallikrein	19
d) Thrombin	19
2. Molekulargewichtsbestimmung	20
3. Bestimmung des reaktiven Zentrums	23
a) Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid	23
b) Inaktivierung des Inhibitors durch das Butandion-Reagens	23
4. Enzymatische Modifizierung des Inhibitors	25
5. Versuche zur temporären Hemmung	25
6. Aminosäure- und Aminozyuckerzusammensetzung	26
7. Endgruppenbestimmung	28
 D. DISKUSSION	 29
1. Isolierung	29
2. Molekulargewicht	30
3. Hemmspektrum	31
4. Reaktives Zentrum	33
5. Modifizierung	33
6. Temporäre Hemmung	34
7. Bausteinzusammensetzung	34
8. Schlußbemerkung	34

E. MATERIAL UND METHODEN	36
I. Material	36
1. Enzyme	36
2. Substrate	37
3. Reagentien und anderes Material	37
II. Methodik	38
1. Enzymbestimmung	38
a) Trypsin-Test	38
b) Plasmin-Test	38
c) Chymotrypsin-Test	39
d) Kallikrein-Test	39
e) Thrombin-Test	39
2. Bestimmung der Inhibitoraktivität	39
3. Eiweißfällung und Konzentrierung	40
4. Vorversuch: Zusätzliche Eiweißfällung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure	40
5. Adsorption und Desorption im Batch-Verfahren	41
6. Vorversuch: Gelfraktionierung an Sephadex G-25	41
7. Vorversuch: Isolierung über Trypsinharz im Batch-Verfahren	41
8. Erste Gelfiltration über Sephadex G-50	42
9. Vorversuch: Bestimmung der Bindungskapazität einzelner Ionenaustauscher	42
10. Vorversuch: Ionenaustauschchromatographie	43
11. Affinitätschromatographie über eine Trypsinharzsäule	46
12. Zweite Gelfiltration und Gefriertrocknung	47
13. Molekulargewichtsbestimmung	47
14. Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid	48
15. Inaktivierung des Inhibitors durch das Butandion-Reagens	49

16. Modifizierungsversuche	49
17. Vorversuch: Verhalten des Plasmin-Inhibitor-Komplexes bei der Gelfiltration	50
18. Versuche zur temporären Hemmung	52
19. Aminosäure- und Aminosäurebestimmung	52
20. Endgruppenbestimmung	53
 F. ZUSAMMENFASSUNG	 54
 G. LITERATURVERZEICHNIS	 56

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
BAEE	N ^{α} -Benzoyl-L-arginin-äthylester
HAPNA	N ^{α} -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid
CM	Carboxymethyl
CPE	Corona penetrating enzyme
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DF	Dekapazitierungsfaktor
DFP	Diisopropyl-fluorphosphat
IU	Inhibitor Unit
mIU	Milli-Inhibitor Unit
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NIH	National Institute of Health
PPP	Pyrophosphat-Semicarbazid-Glycin-Puffer
QAE	Diäthyl-(2-hydroxypropyl)-aminoäthyl
SE	Sulfoäthyl
SSI	Schweinesperma-Inhibitor

SUPHEPA N-^α-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid

TLE Trypsin like enzyme

TPCK L-(α -Tosylamido- β -phenyl)-äthyl-chlor-methylketon

TRA Triäthanolamin-hydrochlorid

U Unit

mU Milli-Unit

A. E I N L E I T U N G

Stoffwechselvorgänge werden durch Enzyme gesteuert. Enzyme sind Katalysatoren der lebenden Zelle von Proteincharakter. Verantwortlich für ihre katalytische Wirksamkeit ist das "aktive Zentrum", das durch besondere Faltung bestimmter Teile von Polypeptidketten entsteht und das eine ausgesprochene Affinität zu dem für jedes Enzym charakteristischen Substrat besitzt.

Der großen Gruppe von Enzymen läßt sich die biologisch und medizinisch wichtige Gruppe der Enzym-Inhibitoren zuordnen. Zahlreiche Proteinasen-Inhibitoren in tierischen und pflanzlichen Geweben und Sekreten wurden entdeckt, seit im Jahre 1929 Kraut, Frey und Werle im Lymphknoten, Parotis, Milz und Leber des Rindes einen Hemmstoff für Kallikrein beschrieben (1).

Viele Arbeitsgruppen versuchen inzwischen Inhibitoren verschiedenster Herkunft rein darzustellen, chemisch zu charakterisieren, den Reaktionsmechanismus der Inhibitoren mit proteolytischen Enzymen zu studieren, und sowohl in vitro als auch in vivo ihre physiologischen Funktionen aufzuklären.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung eines Proteinaseinhibitors aus Sperma des Schweines. Das Hemmverhalten gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Thrombin und Kallikrein wurde geprüft. Darüber hinaus wurde das "reaktive Zentrum" des Inhibitors, das mit dem aktiven Zentrum der Proteinasen reagiert, identifiziert. Weitere biochemische Eigenschaften sowie Molekulargewicht, Endgruppe und Aminosäurezusammensetzung dieses Inhibitors wurden untersucht.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Literaturübersicht

Schon Camus und Gley(2) erkannten ein natürlich vorkommendes Trypsinhemmendes Prinzip im Blutserum. Die ersten Aufzeichnungen über die Art des Stoffes finden sich bei Landsteiner im Jahre 1900(3).

Einer der interessantesten Inhibitoren ist der von Frey, Kraut und Werle 1930 in Leber, Milz, Parotis und Lymphknoten des Rindes entdeckte Inhibitor für Kallikrein(4,5,6). 1936 konnten Kunitz und Northrop(7) einen Trypsininhibitor aus Rinderpankreas kristallin darstellen. Weitere Untersuchungen von Werle und Mitarbeitern(8,9,10) ergaben für beide Inhibitoren gleiches Hemmspektrum(11-26).

Schließlich wurde die Identität der beiden Inhibitoren bewiesen. Es handelt sich um einen polyvalenten Hemmstoff mit relativ breitem Hemmspektrum, der in der Therapie als Trasylol^R breiteste Anwendung findet(103-107).

Der erstmals 1944 dargestellte Inhibitor aus der Sojabohne ist wohl der erste und zugleich wichtigste Vertreter pflanzlicher Inhibitoren(28-34).

Inzwischen wurden weitere pflanzliche und tierische Inhibitoren isoliert und ihre Eigenschaften beschrieben. Eine gute Übersicht bietet die Monographie von Vogel, Trautschold und Werle(27).

1948 wurde von Kazal ein selektiv gegen Trypsin wirksamer Hemmstoff isoliert(35). Fritz und Werle stellten weitere spezifische Trypsininhibitoren dar aus dem Pankreasgewebe und Pankreassekret von Schwein, Rind, Hund und Katze sowie Reh, Ratte, Maus, Ente, Taube und schließlich vom Menschen(36-59). Greene und Mitarbeiter entdeckten zur gleichen Zeit in Pankreassekreten von Rind und Schwein spezifische Trypsininhibitoren(60-62).

1965 untersuchte Haendle in unserem Arbeitskreis bei seiner Nachforschung über die Herkunft des von Astrup 1955 aus menschlichem Harn isolierten Mingin(112) systematisch sämtliche Urogenitalorgane auf Trypsininhibitoren. Im Homogenat der Samenblasen von Schwein, Rind, Schaf, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Hamster und vom Menschen sowie auch im Sperma von Rind, Schwein und Mensch konnte Haendle Trypsininhibitoren nachweisen. Der Inhibitorgehalt dieser Organe gehört zu den höchsten aller Gewebe.

Nach Untersuchungsergebnissen bei Ratte, Maus und Meerschweinchen enthalten andere Sexualorgane wie Hoden, Nebenhoden und die Koagulationsdrüsen im Vergleich zu den Samenblasen erstaunlich wenig Trypsininhibitoren, so daß der im Sperma enthaltene Inhibitor vermutlich vor allem in den Vesikulardrüsen produziert wird. Die Konzentration des Inhibitors im Sperma von Schwein, Rind und Mensch liegt um den Faktor 0,5-2 höher als die Inhibitorkonzentration der Samenblasen. Haendle vermutet einerseits, daß die Samenblasen die Inhibitoren in konzentrierterer Form ausscheiden, andererseits stellt er die Möglichkeit einer Inhibitorkonzentrierung durch Wasserrückresorption zur Diskussion.

Die Abhängigkeit der Inhibitorproduktion in den Sexualorganen vom Spiegel der Sexualhormone wurde von ihm im Tierversuch durch Kastration weißer Mäuse (Inhibitorabfall) und Gabe von Testosteron oder Choriogonadotropin (Anstieg) nachgewiesen(65).

Tabelle 1: Gehalt der männlichen Sexualorgane und deren
Sekrete an niedermolekularen Trypsin-Inhibi-
toren(65)

Konzentrationsangaben in mIU/g Frischgewebe bzw. ml Sekret

Spezies	Testes	Epidi- dymis	Glandula vesiculosa	Sperma
Mensch	70-100	50- 80	50- 100	150- 330
Rind	40- 70	50- 80	900-1500	2400-3100
Schwein	90-120	70-110	500-1000	800-1200
Schaf	-	-	250- 500	-
Ratte	100-200	90-130	1400-1600	-
Maus	90-130	100-200	2200-2700	-
Meer- schweinchen	100-220	300-400	3500-5000	-
Hamster	60- 90	80-120	300- 600	-

II. Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung und Struktur der Inhibitoren

Bei den bisher entdeckten natürlichen Inhibitoren liegen die Molekulargewichte im allgemeinen zwischen 5 000-60 000. Die größere Anzahl der Inhibitoren hat jedoch ein Molekulargewicht unter 20 000.

Bei vielen Proteinaseninhibitoren wurde die Aminosäurezusammensetzung aufgeklärt und danach versucht, Strukturzusammenhänge zwischen verschiedenen Inhibitoren zu finden.

Abgesehen von einigen Seruminhibitoren werden in fast allen anderen Inhibitoren viel Prolin und Cystin gefunden. Die Starrheit der Moleküle und die außerordentliche Stabilität gegenüber denaturierenden Substanzen erklärt sich wahrscheinlich durch den hohen Gehalt an Cystin und Prolin. Dagegen enthalten die meisten Inhibitoren nur wenig oder kein Cystein, Histidin, Tryptophan und Methionin.

Insgesamt sind nur wenig Primärstrukturen von Inhibitoren bekannt, so daß sich noch keine grundsätzliche Ordnung von homologen Inhibitorenklassen aufstellen läßt (17, 41, 51, 67-75).

III. Wirkungsweise und Hemmtyp

Die biochemische Wirkung der Proteinaseninhibitoren beruht im allgemeinen auf einer reversiblen Bindung des Inhibitors an die betreffende Proteinase; die Lage des Gleichgewichts $E + I \rightleftharpoons EI$ wird dabei bestimmt durch die aktuelle H^+ -Konzentration, das Konzentrationsverhältnis Enzym zu Inhibitor und eventuell die Substratkonzentration im Medium.

Das reaktive Zentrum des Inhibitors lagert sich an das aktive Zentrum des Enzyms an. So bilden beide Partner zusammen einen stabilen Komplex und die proteolytische Aktivität des Enzyms ist blockiert.

Konkurrieren Substrat und Inhibitor um die Besetzung des aktiven Zentrums am Molekül, so liegt die sogenannte k o m p e t i t i v e Hemmung vor. Die relative Affinität des Enzyms zum Inhibitor bzw. zum Substrat einerseits und die Konzentration von Inhibitor und Substrat andererseits bestimmen hier das Ausmaß der Hemmung. Die meisten Inhibitoren verhalten sich nach diesem Hemm-Mechanismus.

Eine andere Gruppe von Inhibitoren folgt dem Prinzip der n i c h t k o m p e t i t i v e n Hemmung (76-78).

Laskowski und Wu (79) beobachteten 1953, daß der Komplex von Trypsin mit dem Kazal-Inhibitor nach längerer Inkubation in freies Trypsin und tryptische Spaltprodukte des Inhibitors zerfällt. Sie führten den Begriff "temporary inhibition" für diese Reaktion ein.

Über den Reaktionsmechanismus der temporären Hemmung machten sich bisher vor allem Laskowski und Wu (79) sowie Tschesche und Klein (80) Vorstellungen, die sich gegenseitig nicht ausschließen, sondern vermutlich beide zutreffen (79-80).

IV. Modifizierung

Für die Untersuchung der temporären Hemmung oder für die Bestimmung der für das reaktive Zentrum des Inhibitors verantwortlichen Aminosäure und andere Eigenschaf-

ten eines Inhibitors spielt die Frage nach einer möglichen Modifizierung oft eine entscheidende Rolle. Darunter hat man sich vorzustellen, daß das Inhibitor-molekül an einer Stelle hydrolytisch gespalten wird, ohne dadurch an Hemmaktivität zu verlieren.

Tschesche und Klein zeigten am Beispiel des spezifischen Trypsin-Inhibitors aus Schweinepankreas, daß im p_H -Bereich von 2-10, optimal bei p_H 3,4, eine derartige Modifizierungsreaktion stattfindet(80).

Verschiedene solcher modifizierter Inhibitoren wurden zum Beispiel von Hochstraßer und Werle aus Roggen- und Weizensamen-Inhibitor(82), von Greene und Rigbi aus dem Kazal'schen Inhibitor aus Rinderpankreas(83) und durch Ozawa und Laskowski aus dem Inhibitor von Sojabohnen und Hühnerovomucoid(84) dargestellt.

V. Polyvalenz und Spezifität

Wie bereits angedeutet, können manche Inhibitoren die proteolytische Eigenschaft verschiedener Enzyme unterbinden, besitzen also polyvalenten Hemmcharakter. So umfaßt das Hemmspektrum des polyvalenten Inhibitors aus Rinderorganen(Trasylol^R) sämtliche Organkallikreine, Serumkallikrein, Trypsin, Chymotrypsin A und B sowie Plasmin(11-26, 85, 103-107).

Ein wichtiger Vertreter pflanzlicher Inhibitoren, aus Sojabohnen isoliert, hemmt die Aktivität von Trypsin, Chymotrypsin(86), Plasmin(87), Serumkallikrein(88) und Hurrayn(89).

Neben der Gruppe polyvalenter Inhibitoren wurden zahlreiche Inhibitoren vor allem von Fritz und Werle entdeckt, die jeweils nur ein Enzym zu hemmen vermögen. Die meisten dieser spezifischen Hemmstoffe inhibieren lediglich Trypsin(24, 36-40). Jedoch wurden auch für andere Enzyme spezifische Inhibitoren gefunden. Zum Beispiel tritt im menschlichen Serum in der α_1 -Fraktion auch ein spezifischer Chymotrypsininhibitor auf(122).

VI. Reaktives Zentrum

Die meisten der von natürlichen Inhibitoren hemmbaren Enzyme besitzen im aktiven Zentrum, an dem sich die Umsetzung des Substrats vollzieht, einen Serinrest. Diese Enzyme werden durch DFP im Molverhältnis 1:1 vollständig inaktiviert, da DFP diesen Serinrest phosphoryliert.

Für die Ausbildung des Trypsin-Inhibitor-Komplexes ist wahrscheinlich ein spezieller Lysin- oder Argininrest im reaktiven Zentrum des Inhibitors verantwortlich. Durch chemische Modifizierung der Lysin- oder Argininreste läßt sich die Hemmaktivität von Inhibitoren verringern oder aufheben(91). Grundsätzlich lassen sich daher nach bisherigen experimentellen Ergebnissen zwei Typen von Trypsin-Plasmin-Inhibitoren hinsichtlich ihres reaktiven Zentrums unterscheiden, die sog. "Lysin- und die "Arginininhibitoren". Dies entspricht der Spezifitätsanforderung der betreffenden Serinesterasen(48,49,81). Manche polyvalente Inhibitoren besitzen mehrere reaktive Zentren(91a).

VII. Physiologische Aufgaben der Inhibitoren

Allgemein läßt sich die Aufgabe der in der Natur mannigfaltig vorkommenden Inhibitoren darin sehen, biologisch wichtige Proteinlösungen sowie Gewebe von Proteinstruktur vor körpereigenen und fremden proteolytischen, esteraseischen und eventuell kininliberierenden Enzymen zu schützen. Existieren Inhibitoren und Enzyme nebeneinander in Geweben, so regeln und kontrollieren u.a. die Inhibitoren die katalytische Aktivität der Enzyme. Doch beruht die Deutung der spezifischen physiologischen Aufgaben der Inhibitoren bisher meist nur auf theoretischen Überlegungen. Exakte Beweise fehlen weitgehend, so z.B. auch für die Rolle pflanzlicher Inhibitoren.

1. Pflanzliche Inhibitoren

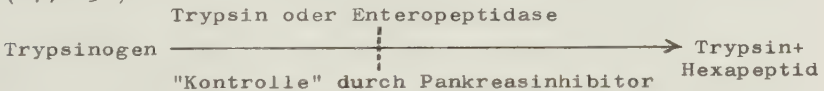
Hier wird einerseits ein Schutz vor Autolyse während des Ruhestadiums oder vor Eindringen von Viren, Bakterien und Pilzen vermutet, andererseits wird eine Steuerung der Stoffwechselvorgänge durch Inhibitoren diskutiert (27, 42, 92, 93).

2. Pankreasinhibitoren

Die im Dünndarm gebildete Enteropeptidase aktiviert durch Abspaltung des Hexapeptids Val-(Asp)₄-Lys das im Pankreas gebildete Proenzym Trypsinogen. Zusätzlich werden die Zymogene des Pankreas durch Trypsin aktiviert.

Pankreasinhibitoren sollen wahrscheinlich eine vorzeitige Aktivierung durch Autokatalyse im Pankreas verhindern.

Eine Freisetzung der proteolytischen Aktivität im Drüsengewebe führt zur Autolyse des Organs. Es entsteht der Zustand einer akuten Pankreatitis mit stets ernster Prognose. (27, 105a).



3. Serum-inhibitoren

Sicherlich übernehmen die im Serum gefundenen Inhibitoren Funktionen bei der Hämostase und Fibrinolyse. Da Homozygote mit beinahe vollständigem α_1 -Antitrypsin-Schwund zu Rezidiven von chronischer Bronchitis, Emphysem und Bronchiektasen neigen, gilt wahrscheinlich das α_1 -Antitrypsin als Schutzfaktor der Lungen gegen Destruktion bei Entzündungen (94).

4. Inhibitoren aus Vesiculardrüsen und Sperma

Die physiologische Funktion der bei vielen Säugetieren vor allem in den Vesiculardrüsen und im Sperma gefundenen Proteinaseinhibitoren ist noch nicht sicher abgeklärt(65,66). Vermutlich werden durch die Existenz von Inhibitoren erst Voraussetzungen geschaffen, die den eigentlichen Befruchtungsvorgang ermöglichen. Doch ist damit keineswegs der Aufgabenbereich der Hemmstoffe umrissen. Analog der Bedeutung der Inhibitoren bei der Hämostase wird der Einfluß der Hemmstoffe auf die Gerinnungsfähigkeit des Spermas diskutiert, deren Mechanismus noch völlig unbekannt ist(75).

Unter "Kapazitierung" versteht man den physiologischen Vorgang, bei dem Spermien ihre volle Befruchtungsfähigkeit erlangen(95-97). Die Kapazitierung läuft je nach Tierspezies in utero oder in der tuba ovarii ab(98). Die Spermien können aufgrund enzymatischer Vorgänge die corona radiata und die dicke Mucoproteinmembran der zona pellucida des Ovum durchdringen. Die lysosomalen Enzyme sind im Akrosom des Spermiums lokalisiert(99). Beim Eindringen des Spermiums in die Eizelle sind wenigstens zwei dieser Enzyme entscheidend wirksam, nämlich das "Corona penetrating enzyme"(CPE) und eine Protease mit trypsinähnlicher Spezifität "Trypsin like enzyme"(TLE)(95, 100-102). Das Spermium durchdringt die corona radiata mit Hilfe des CPE, die zona pellucida mit Hilfe des TLE. Beide Enzyme wurden als Komplex mit einem Molekulargewicht von 59 000 isoliert.

Der lysosomalen Enzymausstattung stehen im Spermaplasma Hemmstoffe gegenüber. So konnte die Aktivität des trypsinähnlichen Enzyms an der zona pellucida von Stambaugh und Buckley 1968 durch Zusatz von Lima- oder Sojabohnen-Inhibitor blockiert werden. Haendle und Mitarbeiter demonstrierten an Kanincheneiern, daß sich die Auflösung der zona pellucida durch akrosomale Spermienextrakte durch die Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen und Humansperma verhindern läßt(65).

Zaneveld, Srivastava und Williams(95) isolierten aus dem Spermaplasma einen Hemmstoff von ganz anderem Charakter, vermutlich ein Polysaccharid, den sogenannten Dekapazitationsfaktor(DF), der die Aktivität des CPE aufhebt. Bei Anwesenheit von DF, dessen Molekulargewicht bei etwa 500 liegt, werden kapazitierte Spermien dekapazitiert, denn sie können nicht mehr die corona radiata durchdringen. Der Mechanismus dieser Dekapazitierung durch DF ist bisher unbekannt. Trypsininhibitoren des Spermas blockieren nicht das Durchdringen des Spermiums durch die corona radiata(95).

In vitro ist in Gegenwart eines der im Plasma enthaltenen Inhibitoren eine Befruchtung nicht möglich, in vivo vermutlich stark herabgesetzt, denn die Hemmstoffe bilden sofort einen stabilen Komplex mit den Enzymen und heben dadurch die Enzymaktivität auf(95, 100-102).

Im weiblichen Genitaltrakt bewegen sich die Spermien schnell vorwärts, die Inhibitoren bleiben zurück. So können die lysosomalen Enzyme ihre volle Wirksamkeit entfalten, die Spermien sind also befruchtungsfähig. Kapazitierte Spermien verfügen allerdings über große Penetrationsfähigkeit im Uterus und werden leicht von Leukozyten phagozytiert. Vielleicht liegt eine der Aufgaben der Hemmstoffe auch darin, die Phagozytose und allgemein das Penetrationsvermögen der Spermien für eine gewisse Zeit nach der Ejakulation zu verhindern(65).

Möglicherweise entfalten sie auch bakteriostatische Funktionen(65).

Vielleicht läßt sich die Untersuchung der Inhibitoren aus Samenflüssigkeit in der Diagnostik der Andrologie verwenden(123).

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

I. Untersuchungsmaterial

Die Inhibitorkonzentration gegenüber Trypsin im Schweine-sperma beträgt etwa 800-1 200 mIU/ml Frischsekret(65). Die trübe Lösung des Rohextraktes läßt eine exakte Bestimmung im optischen Test nicht zu, sodaß der tatsächliche Gehalt an Inhibitor möglicherweise geringer ist.

II. Isolierungsvorgang

1. Eiweißfällung und Konzentrierung

Das gewonnene Sperma wird zur Enteiweißung mit Perchlorsäure versetzt und zentrifugiert. Der inhibitorhaltige Überstand wird neutralisiert, mit konz. Essigsäure auf p_H 5 eingestellt und auf 1 000 mIU/ml eingeeengt.

2. Adsorption und Desorption im Batchverfahren

Im Batchverfahren wird der so vorbehandelte SSI-Extrakt an neutrales SE-Sephadex C-25 adsorbiert und mit 5 proz. Natriumchlorid-Puffer, p_H 7, desorbiert.

Nach dieser Methode wird das gesamte Material aufgearbeitet. Der Gesamtverlust beträgt 12%.

Der nach Ablosung vom Ionenaustauscher stark salzhaltige Extrakt wird am Rotationsverdampfer bis zum Ausfall von Salzen eingeeengt.

Tabelle 2: Adsorption an SE-Sephadex C-25 und Desorption mit 5%igem Natriumchlorid-Puffer im Batch-Verfahren (Versuchsbedingungen s. Methodik)

	Volumen, ml	Inhibitormenge, mIU	% ⁺
Ausgangslösung	10	3000	100
Überstand	10	108	5
abgelöst in 1. Charge	40	1570	52
2. Charge	40	965	30
3. Charge	40	360	12
Gesamtausbeute	120	2895	94

⁺ Bezogen auf die eingesetzte Inhibitormenge

3. Entsalzung durch Dialyse

Der starke Salzgehalt des SSI-Konzentrats läßt eine effektive Entsalzung durch Ultra- oder Gelfiltration zunächst noch nicht zu. Daher werden je 1 000 ml des Konzentrats 6 h gegen 100 l deionisiertes Wasser bei 4°C dialysiert.

Der Verlust bei der Dialyse beträgt 5-10%.

Nach der Dialyse wird das Material am Rotationsverdampfer eingeengt, bis sich ein Niederschlag erkennen läßt. Dann wird die Dialyse unter gleichen Bedingungen und Ergebnissen wiederholt und der Extrakt auf eine Konzentration von etwa 600 mIU/ml eingeengt.

Tabelle 3: Beispiel einer Dialyse gegen 100 l
deionisiertes Wasser

	Volumen, ml	Konzentration, mIU/ml	Gesamtmenge, IU	Ausbeute, %
vor der Dialyse:	4x je 1 000	135	135	
nach der Dialyse:	1 200	98	118	88
	1 500	106	122	90
	1 200	106	127	94
	1 250	98	122	91

4. Erste Gelfiltration und Gefriertrocknung

Das gesamte Material wird nach Dialyse und Einengung über einer Sephadex G-50-Säule entsalzt.

Bei der Gelfiltration ergibt sich durchschnittlich ein Verlust von 5-10%.

Das Eluat wird sofort lyophilisiert. Die so erhaltene Trockensubstanz besitzt eine spezifische Aktivität von etwa 100 mIU/mg, die für einzelne Proben nicht einheitlich ist, sondern zwischen 50 mIU/mg und 150 mIU/mg schwankt.

5. Affinitätschromatographie über Trypsinharz

Bei diesem Schritt wird das 1966 von Fritz und Mitarbeitern entwickelte einfache und spezifische Verfahren zur Isolierung von Proteinase-Inhibitoren angewendet (53).

Das kovalent am Harz fixierte Trypsin bindet aus geeigneten Pufferlösungen spezifisch den Proteinase-Inhibitor. Der Inhibitor wird nach Auswaschen aller Begleitsubstanzen aus dem wasserunlöslichen Komplex mit saurem Puffer wieder abgetrennt.

Ergebnisse: Die Abbildung 1 zeigt die Absorptionskurve eines typischen Isolierungsversuchs mit einer Trypsinharzsäule. Unter gleichen Versuchsbedingungen wird fast immer derselbe Kurvenverlauf erhalten. Die Ausbeute beträgt zwischen 61-97% (s. Tabelle 4), jeweils bezogen auf die an das Enzymharz gebundene Menge an Inhibitor. Die durchschnittliche Ausbeute liegt bei 80%. Die große Streubreite der Einzelergebnisse wird vermutlich vor allem durch den unterschiedlichen Reinheitsgrad des Ausgangsmaterials bedingt.

Tabelle 4: Ausbeute bei der Isolierung des Inhibitors aus Schweinesperma über eine Trypsinharz-Säule

aufgetragene Ausgangsmenge,	gebunden am Trypsin- harz,		vom Trypsinharz eluiert,	
IU, a	IU	%, b	IU	%, c
185	143	77	123	86
205	164	80	112	68
168	123	73	75	61
180	141	78	122	86
59	50	85	48	97
212	147	69	119	81
110	94	86	75	79
325	252	78	180	72
205	146	71	101	69
307	221	72	155	70
235	213	91	142	67
160	122	76	85	70

a) in je ca. 10 ml gelöst

b) bezogen auf die aufgetragene Inhibitormenge

c) bezogen auf die gebundene Inhibitormenge

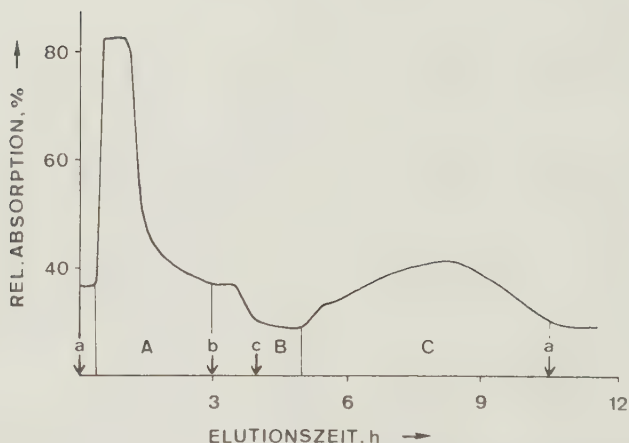


Abbildung 1: Isolierung des Schweinespermainhibitors
über eine Trypsinharzsäule

Ordinate : rel. Absorption, %, bei 253 nm

Abszisse : Elutionszeit, h

Bedingungen: Unter beschriebenen Versuchsbedingungen (s. Methodik) werden auf die mit Puffer a äquilibrierte Trypsinharzsäule 185 IU SSI aufgetragen. Die trübe Fraktion A, mit Puffer a eluiert, enthält 42 IU (22% der Gesamtaktivität). Die mit Puffer b und mit Puffer c eluierte Fraktion B enthält keine Inhibitoraktivität. Die mit Puffer c eluierte Fraktion C enthält 123 IU (Ausbeute 66%) von gereinigtem Inhibitor. Der Gesamtverlust beträgt 12%. Der Elutionsvorgang dauert 10 h.

6. Zweite Gelfiltration und Gefriertrocknung

Das den gereinigten Inhibitor enthaltende Eluat(C) (s. Abb. 1) wird neutralisiert und durch Ultrafiltration mit 5% Verlust eingeeengt. Mehrere solcher Konzentrate werden über eine Sephadex G-50-Säule entsalzt und lyophilisiert. Das lockere weiße Pulver besitzt die spezifische Aktivität von 2 IU/mg.

Hieraus ist ersichtlich, daß durch die einfache und rasche Methode der selektiven Bindung von Inhibitor an Trypsinharz im Säulenverfahren die spezifische Aktivität, ausgehend von 100 (± 50) mIU/mg, auf 2 IU/mg verbessert werden konnte.

Versuche einer weiteren Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie blieben erfolglos.

III. Charakterisierung

1. Hemmverhalten und Hemmspektrum

Zur Untersuchung des Hemmspektrums der gereinigten SSI-Substanz erfolgt die Bestimmung der Hemmaktivität des SSI auf verschiedene Enzyme nach beschriebenen Meßmethoden (s. Methodik).

Trypsin und Plasmin

Der Inhibitor hemmt die enzymatische Aktivität von Trypsin und Plasmin. Zur Untersuchung des linearen Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der Hemmung der Trypsin- bzw. Plasminaktivität und der Konzentration an Inhibitor wird eine definierte Menge Trypsin bzw. Plasmin vorgelegt und nach Zugabe variierender Inhibitormengen (Abszisse) die tryptische Restaktivität (Ordinate) des Enzyms gemessen (Abbildung 2).

Aus der Abbildung 2 ergibt sich eine Linearität bis zu einer Hemmung von etwa 70% des vorgelegten Trypsins und von etwa 50% des vorgelegten Plasmins. Weiterhin erkennt man aus der Abbildung, daß man im Plasmin-test etwa die zehnfache Menge Inhibitor einzusetzen hat, um entsprechende Hemmwirkung zu erzielen. Dies ist auf die wesentlich höhere molare Plasminkonzentration in den Ansätzen zurückzuführen.

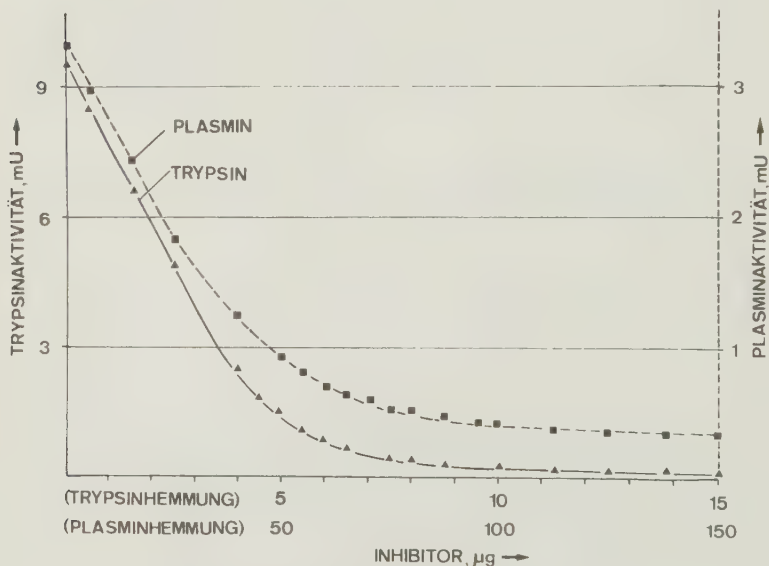


Abbildung 2: Hemmung des Trypsins und Plasmins durch Schweinespermainhibitor (Hemmkurven)

Ordinate: Restaktivität der eingesetzten Menge (Leerwert) an Trypsin bzw. Plasmin, mU, nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an Inhibitor

Abszisse: Zugegebene Menge an Inhibitor, µg

Bedingungen: Enzym und Inhibitor werden in 2,0 ml 0,2 M TRA-Puffer, p_H 7,8, bei 25°C inkubiert (für die Trypsinhemmung: 8 min, für die Plasminhemmung: 10 min, um vollständige Komplexbildung zu erreichen) und 1 ml BAPNA-Substrat Lösung wird hinzugefügt (s. Methodik).

Chymotrypsin

Der Aktivitätsverlust des Chymotrypsins von 10% durch 25 µg SSI, bis zu 50% (linear) durch 125 µg SSI, dem ein molares Verhältnis von Inhibitor zu Enzym von 2,5:1 bzw. 12,5:1 entspricht, ist wahrscheinlich infolge der großen Inhibitormenge lediglich als unspezifischer Hemmeffekt zu deuten oder die Substanz enthält noch etwas Chymotrypsininhibitor.

Kallikrein

Nach der beschriebenen Methode werden 0,03 µg SSI und in einem weiteren Ansatz 0,5 µg SSI mit je 10 mU Pankreaskallikrein inkubiert. Die Ergebnisse zeigen lediglich eine unspezifische Hemmung von 14,5% bei 0,5 µg SSI (vom LW $E_{366}=0,130/10$ min auf $E=0,111/10$ min) (38).

Thrombin

Die enzymatische Aktivität des Thrombins wird durch den Schweinespermainhibitor nicht blockiert. 100 µg SSI beeinflussen die Spaltungsgeschwindigkeit von 4 NIH-Einheiten nicht.

Eine Übersicht faßt das Hemmspektrum des Schweinespermainhibitors zusammen:

Enzym	Hemmung durch SSI
Trypsin	+
Plasmin	+
α -Chymotrypsin	-
Kallikrein (Pankreas, Schwein)	-
Thrombin	-

2. Molekulargewichtsbestimmung

Mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G-75 wird das Molekulargewicht des Inhibitors bei verschiedenen p_H -Werten bestimmt. Eichsubstanzen von bekanntem Molekulargewicht werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße getrennt. Für die Moleküle besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes und ihrem Elutionsvolumen (57).

Die Abbildungen 3 A und B zeigen die Elutionskurven, die sich bei der Auftrennung von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht an der Sephadex G-75-Säule in neutraler (A) und saurer (B) Lösung ergeben.

Zur Auswertung werden genau die Elutionsvolumina der Absorptions- bzw. Aktivitätsmaxima bestimmt. Sie sind der Auswertungstabelle 6 zu entnehmen.

Zur graphischen Auswertung (Abbildung 4) wird ein Koordinatensystem verwendet, dessen Abszisse das Molekulargewicht im logarithmischen Maßstab und dessen Ordinate das Verhältnis der Elutionsvolumina der Proteine zum Leervolumen V_0 der Säule (Elutionsvolumen des Dextranblau) darstellt. Aus der Eichkurve läßt sich aus dem Verhältnis Elutionsvolumen der Testsubstanz zum Leervolumen V_0 das gesuchte Molekulargewicht ablesen.

Bei mehreren Bestimmungen wird bei p_H 7,0 ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 12 000, bei p_H 2,2 ein Molekulargewicht von 13 500 gefunden.

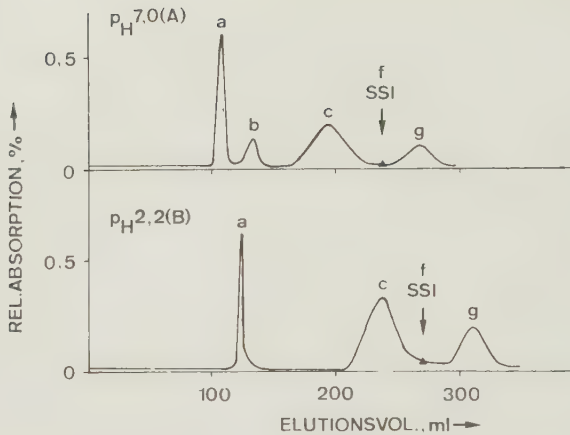
Tabelle 5: Molekulargewichtsbestimmung

Substanz	aufgetragene Menge, mg	Molekulargewicht
(a) Dextranblau	0,5	
(b) Humanalbumin	3	68 000
(c) Chymotrypsinogen A	3	25 000
(d) Cytochrom C	3	13 000
(e) Ribonuclease	3	13 900
(f) SSI	3	
(g) Trasylol ^R	3	6 500

Tabelle 6: Versuchsauswertung zur Molekulargewichtsbestimmung

p _H 7,0			p _H 2,2		
V, cm ³	$\frac{V}{V_0}$	Substanz ⁺⁾	V, cm ³	$\frac{V}{V_0}$	
6 x 18	1	(a)	6,8 x 18	1	
7,4 x 18	1,23	(b)			
10,8 x 18	1,8	(c)	13,2 x 18	1,94	
13,2 x 18	2,2	(f)	15 x 18	2,2	
15 x 18	2,5	(g)	17,2 x 18	2,53	

⁺⁾ Substanzen s. Tab.5



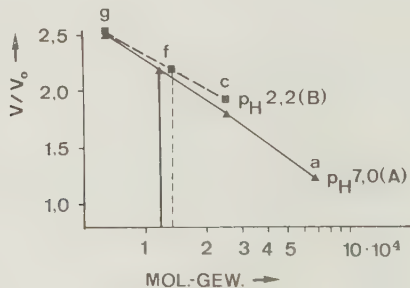
Abbildungung 3: Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex G-75 in neutraler (A) und in saurer Lösung (B)

Ordinate : rel. Absorption, %, bei 253 nm

Abszisse : Elutionsvolumen, ml

Bei dem Pfeil (SSI) liegt das im Trypsin-Hemmtest ermittelte Aktivitätsmaximum des SSI

Versuchsbedingungen (s. Methodik)



Abbildungung 4: Graphische Auswertung der Elutionsdiagramme in Abb. 3

Ordinate : Elutionsvolumen der Proteine pro Leervolumen der Säule (bestimmt mit Dextranblau) = V/V_0 , ml/ml

Abszisse : Molekulargewicht

3. Bestimmung des reaktiven Zentrums

Das Trypsin-Plasmin-Hemmzentrum der natürlichen Proteinase-Inhibitoren besteht nach bisherigen Ergebnissen aus einem Lysylrest oder Arginylrest, bzw. einer Peptidsequenz mit einem dieser Reste (43, 48, 49, 84, 91), der sich spezifisch an das aktive Zentrum des Enzyms anlagert.

a) Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid

Mit Hilfe des Maleinsäureanhydrids (50) werden die ϵ -Aminogruppen der Lysylreste modifiziert. Erfolgt durch die (in saurer Lösung reversible) Acylierung der Aminogruppe ein Verlust der Inhibitoraktivität, dann ist für die Aktivität des Inhibitors ein Lysylrest verantwortlich.

Nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid zeigt die Bestimmung der Hemmaktivität des Inhibitors keinerlei Aktivitätsverlust. Gleiches Ergebnis wird nach Zusatz von weiterem Maleinsäureanhydrid zur Lösung erzielt. Aus dem Ergebnis folgt, daß die Hemmaktivität des SSI offensichtlich nicht auf einem Lysylrest im reaktiven Zentrum beruht.

b) Inaktivierung des Inhibitors durch das Butandion-(2,3)-Reagens

Das reaktive Zentrum typischer Arginylinhibitoren, die nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid keinen Verlust ihrer Hemmwirkung gegenüber Trypsin zeigen, läßt sich mit Hilfe des Butandion-(2,3)-Reagens spezifisch modifizieren. Sie verlieren nach kurzer Zeit ihre Hemmaktivität fast vollständig (50).

Die Abbildung 5 läßt erkennen, daß die Hemmaktivität des Inhibitors gegenüber Plasmin und Trypsin sehr rasch fast parallel abnimmt. Bereits nach 30 min läßt sich gegenüber beiden Enzymen eine Hemmaktivität von weniger als 7% der Ausgangswerte nachweisen, die bei längerer Inkubation noch weiter abnimmt. Das ähnliche Verhalten gegenüber Trypsin und Plasmin bei der Inaktivierung läßt auf ein einziges Zentrum mit einem Arginylrest für beide Proteinasen schließen.

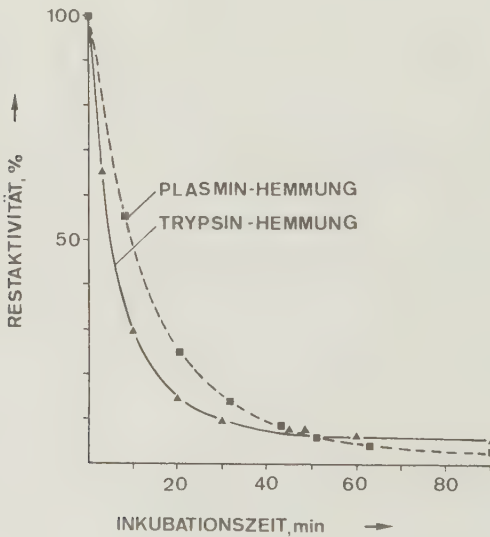


Abbildung 5: Inaktivierung des Inhibitors durch das Butandion-(2,3)-Reagens

Abszisse : Zeitpunkt der Messung der verbleibenden Restaktivität (s. Ordinate) nach der Inkubation des Polymaleoyl-SSI mit dem Butandion-(2,3)-Reagens, min

Ordinate : Verbleibende Restaktivität des Inhibitors gegenüber Trypsin und Plasmin bezogen auf die Ausgangsaktivität der Lösung vor Butandionzusatz, %

Versuchsbedingungen (s. Methodik)

4. Enzymatische Modifizierung des Inhibitors

Die vor allem im Verdauungsssekret, aber auch in Niere, Milz und Pankreas vorkommende Carboxypeptidase B spaltet spezifisch die vorher von bestimmten Proteinasen unter Modifizierung (Spaltung einzelner Arg-X-bzw. Lys-X-Bindungen, wobei die Inhibitoraktivität kaum beeinträchtigt wird,) freigelegten, nun Carboxyl-endständigen Aminosäuren ab. Existiert solch eine modifizierte Arg-X-Bindung im reaktiven Zentrum des Inhibitors, so verliert dieser nach Inkubation mit Carboxypeptidase B unter entsprechenden Bedingungen seine Hemmaktivität.

Carboxypeptidase B wird zum gelösten Schweinesperminhibitor gegeben.

Ergebnis:

Messungen nach 24h und 48h ergeben gleiche Aktivitäten der Test- und Vergleichsproben, die zugleich der Ausgangsaktivität entsprechen ($\pm 6\%$ Streubreite).

Das Ergebnis besagt, daß der über das Trypsinharz isolierte Inhibitor in nicht modifizierter Form vorliegen muß. Die Arg-X-Bindung des reaktiven Zentrums ist intakt, da die Inkubation mit Carboxypeptidase B die Hemmaktivität des Inhibitors nicht verändert, denn Carboxypeptidase B kann nur spezifisch die vorher von Proteinasen unter Modifizierung freigelegten Lys- oder Arg-Reste abspalten und so den Inhibitor inaktivieren.

5. Versuche zur temporären Hemmung

Liegt in der Inkubationslösung Trypsin gegenüber dem Inhibitor im Überschuß vor, so wird ein Inhibitor bei temporärer Hemmung mehr oder weniger rasch zerstört.

Der SSI wird mit 50% Trypsin im Überschuß inkubiert. Die tryptische Restaktivität, in bestimmten Zeitabständen bestimmt, zeigt einen geringen kontinuierlichen Abfall. Die Abnahme der tryptischen Aktivität von nahezu 25% (bezogen auf die erste Hemmung nach Inhibitorzusatz) nach 24h erklärt sich als Autolyse des Trypsins bei der Inkubation.

Untersuchungen mit einem Hemmgrad des Inhibitors gegenüber TPCK-Trypsin von 30% oder gegenüber Plasmin bei gleichen Hemmgraden wie vorher für das Enzym unter sonst gleichen Bedingungen erzielen entsprechende Ergebnisse.

Die vorliegenden Ergebnisse schließen ein typisches temporäres Hemmverhalten des Inhibitors aus.

6. Aminosäure- und Aminozyuckerzusammensetzung

Die Aminosäure- und Aminozyuckerbestimmung wird nach der Methode von Spackman, Stein und Moore durchgeführt (115). Die Tryptophanbestimmung erfolgt spektralphotometrisch (18).

Die nachfolgende Tabelle 7 zeigt das Ergebnis mehrerer Untersuchungen in einer zusammenfassenden Übersicht.

Bei einer Gesamtzahl von 104 Einzelbausteinen enthält der Inhibitor neben wenig Galactosamin, Glucosamin, Methionin und Tryptophan auffallend viel Prolin und Cystein.

Nach der Aminosäureanalyse errechnet sich ein Molekulargewicht von 11 607 unter Bezugnahme auf das Ergebnis nach der Molekularsiebmethode.

Tabelle 7: Aminosäure- und Aminozyckerkzusammensetzung
des Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus
Schweinesperma

Hydrolysezeit, h	20	70	122	
Aminosäure				$\frac{AS}{mol}$
CysSO ₃ H	7,2 ^b			
MetO ₂	1,4 ^b			
Asp	10,75	10,75	10,84	11
Thr	5,95	5,71	5,60	6
Ser	6,82	6,00	5,34	7
Glu	8,26	8,11	8,09	8
Pro	4,56	4,08	4,28	4
Gly	7,82	7,92	7,89	8
Ala	4,32	4,32	4,32	4
Cys	5,85	8,16	2,04	8
Val	1,54	1,87	1,88	2 ^c
Met		1,10		4
Ile	2,83	3,97		4
Leu	5,47	4,13	3,87	4
Tyr	4,12	4,37	3,05	4
Phe	7,25	7,34	7,33	7
Lys	8,00	8,04	7,99	8
His	3,98	3,97	3,90	4
Arg	8,25	8,13	8,10	8
Trp	(1,57) ^d			2
Aminozycker				$\frac{AZ}{mol}$
Glucosamin	2,3	1,1	0,6	3
Galactosamin	1,5	0,7	0,3	2
Summe				104
Molekulargewicht ^a				11607

a) Weitere Untersuchungen für andere Reste (z.B. Neutralzucker, Sialinsäuren etc.) stehen aus.

b) Nach Oxydation mit Ameisensäure

c) Errechnet aus der oxydierten Form

d) Bestimmt mit der spektrophotometrischen Methode (18)

7. Endgruppenbestimmung

Die N-terminalen Aminosäuren von Peptiden werden nach der Dansylmethode bestimmt(116). Dazu werden Inhibitorfraktionen mit DNS-Chlorid(1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid) umgesetzt. Nach Hydrolyse der dansylierten Peptide lassen sich die markierten Aminosäuren durch zweidimensionale Chromatographie identifizieren (117, 118).

Ergebnis:

Mehrere Endgruppenbestimmungen ergaben, daß die N-terminale Gruppe des Inhibitors aus Lysin besteht.

D. D I S K U S S I O N

1. Isolierung

Bei der Isolierung des Inhibitors aus Schweinesperma erweist sich nach bisherigen Untersuchungen zunächst die Reinigung des Materials mit Hilfe von Sulfoäthyl-Sephadex C-25 im Batch-Verfahren als sinnvoll.

Eine hohe Ausbeute mit großem Reinigungseffekt zeichnet diesen Schritt aus.

Die starke Bindungskapazität des Inhibitors an einen Kationenaustauscher läßt darauf schließen, daß sein isoelektrischer Punkt im basischen Bereich liegt.

Fast kein Verlust ergibt sich bei der weiteren Aufarbeitung durch Einengung, Dialyse gegen deion. Wasser, Gelfiltration (Sephadex G-50, 5%ige Essigsäure) und Gefriertrocknung.

Eine Reinigung des Inhibitors von Fremdprotein durch Fällung mit Trichloressigsäure ergibt einen großen Verlust an Inhibitor (Vorversuch). Zaneveld und Mitarbeiter verzichteten nicht auf die Behandlung des Inhibitors aus Schweinesperma mit Trichloressigsäure bei der Isolierung. Eventuell sind die unterschiedlichen Ergebnisse der Aminosäureanalyse seiner Arbeitsgruppe und der unsrigen darauf zurückzuführen (119, 120). Wir nehmen jedoch an, daß beide Arbeitsgruppen verschiedene Inhibitoren isolierten.

Bei der Chromatographie des SSI an Ionenaustausch-Säulen (Sulfoäthyl-Sephadex C-25) wird der Inhibitor nicht in verschiedene aktive Fraktionen aufgetrennt und keine große Reinigung erzielt (s. Vorversuch) im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Inhibitor aus Samenblasen des Meerschweinchens (75).

Für die selektive Bindung des Inhibitors an das Trypsinharz(53) eignet sich vor allem durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration vorgereinigtes, salzfreies Material. Offensichtlich ist der Prozentsatz der Ausbeute, nicht jedoch die nach den Versuchen erhaltene spezifische Aktivität vom Reinheitsgrad des Ausgangsmaterials abhängig. Je höher die spezifische Aktivität der eingesetzten Substanzen, desto geringer ist unter gleichen Bedingungen der Verlust. Die Streubreite der Ausbeute (s. Tab. 4) einzelner Versuche läßt sich wohl hauptsächlich mit dem unterschiedlichen Reinheitsgrad der eingesetzten Proben erklären.

2. Molekulargewicht

Nach jeder Isolierung über das Trypsinharz ergibt sich eine stets einheitliche spezifische Aktivität von 2 IU/mg (Trypsinhemmung). Die spezifische Aktivität läßt ein Molekulargewicht von etwa 13 000 erwarten.

Bei der Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Dextran-Gelfiltration über eine Sephadex G-75-Säule findet sich in saurer Pufferlösung ($P_{H,2,2}$) ein Wert von annähernd 13 500, im neutralen Milieu von nahezu 12 000.

Die Fehlerbreite dieser Methode wird mit ± 300 angegeben (57). Eine Voraussetzung für eine exakte Bestimmung des Molekulargewichts mit der Gelfiltration ist die homologe Molekülgestalt der Eichsubstanzen und der Testsubstanz. Sie sollten etwa globulär gebaut sein.

Die Ursache des unterschiedlichen Molekulargewichts des Schweinespermainhibitors bei Messungen im neutralen und sauren Milieu liegt wahrscheinlich in einer reversiblen Änderung der Tertiärstruktur (Aufaltung, Schrumpfung) und dadurch bedingten Größen- und Gestaltsänderung der Inhibitormoleküle, die durch eine Verschiebung der elektrostatischen Ladungen innerhalb des Moleküls hervorgerufen wird.

Das gleiche Phänomen wird auch bei der Molekulargewichtsbestimmung anderer Inhibitoren und verschiedener Proteine beobachtet.

Aufgrund des hohen Reinheitsgrads des Inhibitors ist ein Einfluß von assoziierten Fremdproteinen auf die Ergebnisse auszuschließen. Auch kommt eine Verschmierung der Ergebnisse durch Anlagerung des Inhibitors an Substanzen mit ähnlichem Molekulargewicht wie Ribonuclease oder Cytochrom C nicht in Betracht, da die Säule mit diesen Substanzen bei der SSI-Molekulargewichtsbestimmung nicht beschickt wurde.

Das Ergebnis der Molekulargewichtsberechnung aus der Aminosäure- und Aminozuckeranalyse mit einem Wert von 11 607 entspricht sehr gut den bisher diskutierten Ergebnissen.

3. Hemmspektrum

Der Inhibitor aus Schweinesperma hemmt die Aktivität von Trypsin und Plasmin. Aufgrund bisheriger Untersuchungen stimmt das Ergebnis mit der Annahme überein, daß vermutlich im Sperma aller Säugetiere Trypsin-Plasmin-Inhibitoren vorkommen.

Neben den Trypsin-Plasmin-Inhibitoren ließen sich im männlichen Genitaltrakt verschiedener Spezies weitere Inhibitoren mit anderem Hemmspektrum nachweisen. So existiert in den Samenblasen des Stiers ein zweiter Inhibitor, der neben Trypsin und Plasmin zusätzlich Chymotrypsin und Kallikrein aus Serum, Harn und Organen hemmt. Aus den Samenblasen des Meerschweinchens isolierte E. Fink sowohl Trypsin-Plasmin-Inhibitoren als auch spezifische Trypsininhibitoren (75).

Das Vorkommen mehrerer Inhibitoren mit verschiedenem Hemmspektrum nebeneinander im männlichen Genitaltrakt erschwert die Aufklärung ihrer physiologischen Aufgabe. Immerhin konnten Zaneveld und Mitarbeiter zeigen, daß der spezifische Trypsin-Inhibitor aus den Samenblasen des Meerschweinchens den Befruchtungsvorgang weniger hemmend beeinflußt als der Trypsin-Plasmin-Inhibitor (119).

Die verbleibende Restaktivität von Trypsin bzw. Plasmin im optischen Test ist quantitativ abhängig von variierenden Mengen an zugesetztem Inhibitor aus Schweinesperma. Diese Beziehung entspricht im Charakter vielen Hemmkurven von anderen Inhibitoren gegenüber proteolytischen Enzymen. Die Hemmung nimmt bei Zugabe steigender Mengen Inhibitor meist nur bis zu einem gewissen Hemmgrad linear mit der Inhibitormenge zu. Für eine vollständige Hemmung des Enzyms ist in solchen Fällen ein Inhibitor im Überschuß notwendig.

Es gibt auch Inhibitoren, die ein Enzym vollständig ohne Inhibitorüberschuß hemmen können. Zum Beispiel hemmen die Inhibitoren aus Schweinepankreas und aus menschlichem Pankreassekret die Trypsinaktivität bis zu 100% linear (121).

Die Hemmung von ca. 15% der Aktivität von 10 mU (= 0,1 µg) Kallikrein im üblichen Kallikrein-Hemmtest durch 0,5 µg SSI läßt sich nur als unspezifischer Hemmeffekt deuten. Setzt man die Bildung eines 1:1 Inhibitor-Enzym-Komplexes voraus, so müßten unter Berücksichtigung der Molekulargewichte beider Partner etwa 0,03 µg SSI die Aktivität von 0,1 µg Kallikrein hemmen (38). Eine entsprechende Wertung verdient das Ergebnis des Chymotrypsin-Hemmtestes.

Die Ursache für unspezifische Hemmeffekte ist nicht geklärt. Möglicherweise stellt der Inhibitor ein Substrat für das betreffende Enzym dar, wird also langsam abgebaut und konkurriert so mit den verwendeten Substraten (121).

4. Reaktives Zentrum

Das Verhalten des SSI bei der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid und anschließend mit Butandion-(2,3)-Reagens weist ihn als Vertreter typischer Arginin-Inhibitoren aus. Bei der Behandlung mit Maleinsäureanhydrid behält er seine volle Hemmaktivität gegenüber Trypsin und Plasmin.

Die rasche Abnahme der Hemmaktivität des SSI nach Zusatz des Butandion-(2,3)-Reagens ist charakteristisch für alle Arginin-Inhibitoren. H. Fritz und andere demonstrierten in ausgedehnten Untersuchungen, daß die verbleibende Restaktivität der Polymaleoyl-Arginyl-Inhibitoren nach zweistündiger Inkubation mit dem Butandion-(2,3)-Reagens in allen Fällen weniger als 10% des Ausgangswertes beträgt (50,75).

Da die Hemmaktivität des SSI gegenüber Trypsin und Plasmin in gleicher Weise erlischt (s. Abb. 5), läßt sich daraus schließen, daß das reaktive Zentrum für Trypsin mit dem für Plasmin identisch ist.

5. Modifizierung

Offensichtlich wird das reaktive Zentrum des Inhibitors aus Schweinesperma bei der Isolierung am Trypsinharz nicht modifiziert (Spaltung einzelner Lys- bzw. Arg-X-Bindungen), denn der Inhibitor behält seine Hemmaktivität sowohl nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid als auch vor allem nach Inkubation mit Carboxypeptidase B. Letztere müßte den nach einer Modifizierung freigesetzten Argininrest abspalten.

6. Temporäre Hemmung

Der Inhibitor aus Schweinesperma gehört zu den "permanenten Inhibitoren", d.h. er wird auch bei langer Inkubation mit Trypsin von diesem nicht abgebaut.

Sicherlich spielt bei dieser Frage u.a. die Aminosäurezusammensetzung, die Tertiärstruktur und die Molekülgröße des Inhibitors, -Faktoren, die sich gegenseitig bedingen und beeinflussen, -eine entscheidende Rolle. Die meisten Inhibitoren mit Molekulargewichten unter 12 000 gehören zu den temporären Inhibitoren (62, 73, 79, 122).

7. Bausteinzusammensetzung

Hier fällt der hohe Gehalt an Prolin- und Cystinresten auf, der eventuell die Starrheit der SSI-Moleküle und ihre außerordentliche Stabilität gegenüber denaturierenden Substanzen bedingt.

Noch wurde nicht geprüft, ob der Inhibitor neben Glucosamin und Galactosamin zusätzlich Neutralzucker und weitere Amino Zucker oder Sialinsäurereste enthält (120).

Solche Komponenten müßten eventuell zusätzlich berücksichtigt werden.

8. Schlußbemerkung

Aus physiologischer Sicht erscheint es interessant, daß sich bisher im Sperma des Schweines nur ein Trypsin-Plasmin-Inhibitor finden ließ. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um abzuklären, ob wirklich nur ein Trypsin-Plasmin-Inhibitor im Sperma existiert oder ob wir und die Arbeitsgruppe von Zaneveld (119) einen Trypsin-

spezifischen Inhibitor übersehen haben, der möglicherweise bei der Säurebehandlung ausgefällt wurde. Eventuell aber ist ein Trypsin-spezifischer Inhibitor unlöslich an Samenblasenzellen gebunden oder aber er kommt bei dieser Spezies überhaupt nicht vor(120).

E. MATERIAL UND METHODEN

I. Material

1. Enzyme

Trypsin (EC 3.4.4.4), Novo Industri, Kopenhagen, 23,5 AE/g, 4365 NF/mg, krist., lyophil.; 5 mg in 100 ml 0,0025 n HCl lösen, bei 0-4°C zur Verhinderung der Autolyse aufbewahren.

Plasmin (EC 3.4.4.14), Novo Industri, Kopenhagen, 2,77 Novo Einheiten/mg lyophil.; 1 mg in 0,4 ml 0,0025 n HCl lösen, bei 0-4°C aufbewahren.

Chymotrypsin (EC 3.4.4.5), Novo Industri, Kopenhagen, 1 100 NF/mg, krist., lyophil.; 1 mg in 0,5 ml 0,0025 n HCl lösen, bei 0-4°C aufbew.

Kallikrein (Pankreas, Schwein), Farbenfabriken Bayer AG, Bayer SK-K141/1, nach Reinigung 99,5 U/mg (Spezif. Aktiv.)

Thrombin (EC 3.4.4.13)

Alkoholdehydrogenase (ADH), Boehringer Mannheim, 30 mg ADH/ml bidest H₂O im Eisbad

Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD), Boehringer Mannheim, 20 mg NAD/ml bidest H₂O, im Eisbad

Carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2), Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, DFP-behandelt,

2. Substrate

N^{α} -Succinyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid, SUPHEPA, Mann Res. Lab., New York; 5 mg SUPHEPA in 1 ml Puffer (0,2 M TRA+0,02 M CaCl_2 , p_H 7,8 bei 70-90°C im Wasserbad lösen.

N^{α} -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid, BAPNA, Merck; 100 mg BAPNA in 100 ml deion. Wasser bei 70-90°C i.W. lösen.

N^{α} -Benzoyl-L-arginin-äthylester, BAEE, Merck; $3 \times 10^{-3} \text{M}$: 1,0 mg BAEE $\cdot \text{HCl}$ /ml bidest H_2O , im Eisbad

3. Reagentien und anderes Material

Triäthanolamin-hydrochlorid (TRA), EGA-Chemie;

Pyrophosphat-Semicarbazid-Glycinpuffer, PPP (15,2 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ + 4,1 g Semicarbazid + 0,9 g Glycin in bidest H_2O lösen, mit 2 n NaOH auf p_H 8,7 einstellen und auf 500 ml auffüllen.)

Maleinsäureanhydrid, Schuchardt;

Butandion-(2,3), EGA-Chemie;

Andere Reagentien, Reinheitsgrad: p.a., Merck, wenn nicht anders vermerkt;

Anderes Material:

Sephadex^R G-25 fine, G-50 medium, G-75 for gel filtration, Pharmacia, Uppsala, Schweden;

Sephadex^R-Ionenaustauscher, Pharm. Uppsala, Schweden:

DEAE A-25 (Diäthylaminoäthyl)

QAE A-25 (Diäthyl-(2-hydroxypropyl)-aminoäthyl)

CM C-25 (Carboxymethyl)

SE C-25 (Sulfoäthyl)

Trypsinharz

Bei dem von Fritz und Mitarbeitern entwickelten Verfahren zur Isolierung von Proteinasen-Inhibitoren werden im Prinzip Enzyme kovalent an ein Grundgerüst gebunden ohne Verlust ihrer biologischen Aktivität. Die am Harz fixierten Enzyme binden aus geeigneter Pufferlösung selektiv den Proteinasen-Inhibitor(53).

Die polyamphotere Harzmatrix des verwendeten Harzes leitet sich aus einem Kopolymer aus Maleinsäure und Äthylen ab. Die Trypsinmoleküle sind amidartig über Aminogruppen mit dem Grundgerüst verknüpft. Durch amidartig gebundenes Hexamethyldiamin sind die Ketten quervernetzt. Zusätzlich ist N-N-Dimethyl-äthylen-diamin in die Harzmatrix in Säureamidbindung eingebaut, um den anionischen Charakter abzuschwächen(53).

II. Methodik

1. Enzymbestimmung

Definition der Enzymeinheit:

1 Enzymeinheit(U) setzt unter Standardbedingungen 1 μ Mol Substrat pro Minute um(109).

Die Bestimmungen werden nach bekannten Methoden durchgeführt.

a) Trypsin-Test:

Das Substrat BAPNA wird durch Trypsin hydrolytisch gespalten. Die Geschwindigkeit der Freisetzung von p-Nitroanilid wird am Photometer bei 405 nm gemessen(27,45,58,110).

b) Plasmin-Test:

Substrat: BAPNA(58)

c) Chymotrypsin-Test:

Substrat: SUPHPPA

Die Geschwindigkeit der Umsetzung des Substrats wird wie bei BAPNA bestimmt (24,58).

d) Kallikrein-Test:

0,1 ml NAD-Lösung, 2,28 ml PPP-Puffer (bzw. 2,38 ml PPP ohne Kallikrein in der Vergleichsküvette), p_H 8,7; 0,5 ml BAEE und 0,02 ml ADH werden in die Meßküvette pipettiert. Der Ansatz wird 5 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zusatz von 0,1 ml Kallikrein gestartet, die 2-10 mU enthalten können.

Nach 2 min wird der Ausgangswert der Extinktion bei 366 nm bestimmt. Nach weiteren 5 und 10 min erfolgt wieder Ableseung der Werte.

1 mU Kallikrein entspricht einer Extinktionsänderung ΔE von 0,0011/min oder dem Umsatz von 1 μ Mol Substrat/min.

e) Thrombin-Test:

Substrat: BAPNA (58)

2. Bestimmung der Inhibitoraktivität

Definition der Inhibitor-Einheit:

1 Inhibitor-Einheit (IU) hemmt die Aktivität von 2 Enzymeinheiten zu 50% und vermindert daher den Umsatz des Substrats um 1 μ Mol/min (27,85).

Die nach beschriebener Methode bestimmte Enzymaktivität (Leerwert) wird durch Zugabe von Inhibitorlösung vermindert (Hemmansatz). Aus der Abnahme der Extinktionsänderung ΔE gegenüber dem Vergleichswert ohne Inhibitorzusatz (Leerwert) läßt sich der Inhibitorgehalt der Testlösung unmittelbar berechnen (45), denn die Substratumsetzung wird durch Enzymblockierung verzögert (27,55,85).

3. Eiweißfällung und Konzentrierung

Das in der Besamungsanstalt gewonnene Sperma wird zur Enteiweißung sofort mit 6%iger Perchlorsäure im Volumenverhältnis 1:1 versetzt und bis zur Aufarbeitung bei 0-4°C aufbewahrt.

Die Verlustrate durch Enteiweißung wird nicht exakt bestimmt, da die noch trübe Lösung das Testergebnis verfälscht.

Das ausgefällte Protein wird mit der Christ Universal Kälzentrifuge III KS bei 0-4°C 30 min mit 3-6 000 U/min abzentrifugiert.

Der inhibitorhaltige Überstand wird durch Zugabe von festem Kaliumcarbonat neutralisiert. Nach mindestens 1 h Stehenlassen bei 0-4°C wird die Lösung vom ausgefallenen Kaliumperchlorat unter gleichen Bedingungen wie vorher abzentrifugiert. Der Überstand wird mit konz. Essigsäure auf p_H 5 eingestellt und am Rotationsverdampfer im Vakuum einer Wasserstrahlpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 30-40°C bis zu einer Konzentration von 1000 mIU/ml eingengt. Das Konzentrat wird erneut wie vorher zentrifugiert und bei 0-4°C gelagert. p_H -Kontrolle und Zentrifugation werden nach Tagen wiederholt.

4. Vorversuch: Zusätzliche Eiweißfällung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure

Eine wie oben behandelte Extraktprobe wird mit 10%iger Perchlorsäure, eine zweite mit 10%iger Trichloressigsäure im Volumenverhältnis 1:2 versetzt, durchmischt und einige min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände werden mit 2 n Natronlauge neutralisiert, zentrifugiert und getestet. Eine mit 0,2 M TRA-Puffer auf gleiches Volumen versetzte dritte Probe dient als Vergleichswert. Die mit Perchlorsäure behandelte Probe verliert 15% des Inhibitorgehalts, der Verlust der mit Trichloressigsäure behandelten Probe beträgt 70%. Eine Weiterbehandlung des SSI-Extrakts mit Trichloressigsäure bringt also zu große Verluste.

5. Adsorption und Desorption im Batchverfahren

Der mit konz. Essigsäure auf p_H 5 eingestellte SSI-Extrakt mit einer Konzentration von ca. 300 mIU/ml wird nach 30 min Rühren zu etwa 95% an regeneriertes, neutral gewaschenes SE-Sephadex C-25 adsorbiert. Nach Absaugen über der Fritte oder Zentrifugieren enthält der trübe Überstand nur etwa 5% der Inhibitor-Konzentration der Ausgangslösung und wird daher verworfen. Mit 5%igem Natriumchlorid-Puffer, p_H 7, wird der Inhibitor nahezu vollständig vom Ionenaustauscher abgelöst. Die Desorption erfolgt mit mehreren kleinen Volumina Puffer nach je 5 min Rühren.

6. Vorversuch: Gelfraktionierung an Sephadex G-25

Die Gelfraktionierung des Extrakts an Sephadex G-25 (Säulengröße: 2,5 x 100 cm; Puffer: 5%ige Essigsäure; Verlust: 10%) vor dem Ionenaustauschprozeß ergibt insgesamt keine besseren Ergebnisse. Daher wird in der weiteren Materialaufarbeitung auf eine Entsalzung vor dem Batch-Verfahren verzichtet.

7. Vorversuch: Isolierung über Trypsinharz im Batchverfahren

Bei dieser Methode darf die Temperatur von 0°C möglichst nicht überschritten werden. Die substratspaltende Aktivität des an das Harz gebundenen Trypsins ist unter den Versuchsbedingungen nahezu aufgehoben, während mit dem Inhibitor noch eine rasche Komplexbildung erfolgt (24, 25, 37). Die Herstellung des bei allen folgenden Versuchen verwendeten Trypsinharzes erfolgt nach der Vorschrift von Inman und Dintzis (114).

Das Trypsinharz wird vor der Zugabe der Inhibitorlösung wiederholt mit 0,35 M NaCl + 0,05 M TRA-Puffer gewaschen und das p_H der Suspension auf p_H 7,8 eingestellt. Das nach der Dialyse eingeeengte SSI-Konzentrat wird nach vorheriger p_H -Kontrolle in einer der Kapazität des Harzes entsprechenden Menge mit dem Trypsinharz mehr als 30 min gerührt. Das p_H wird in Zeitabständen gemessen und gegebenenfalls auf p_H 7,8 nachgestellt. Die Inhibitorkonzentration der Lösung wird wiederholt bestimmt. Nach Adsorption des Inhibitors wird das Harz abzentrifugiert

und in einer gekühlten Säule mit 0,35 M NaCl+0,05 M TRA-Puffer gewaschen. Die Absorptionskurve (bei 253 nm) läßt erkennen, wann das mit Inhibitor beladene Enzymharz von allen unerwünschten Begleitsubstanzen befreit ist. Zusätzliche Trypsintests ergänzen die Kontrolle der Elution auf Inhibitor. Infolge rascher p_H -Änderung durch Pufferwechsel mit 0,3 M KCl/HCl Puffer, p_H 2,0, erfolgt die Dissoziation des Inhibitor-Trypsinharz-Komplexes und die Elution des gereinigten Inhibitors. Es werden nur 60% von dem an das Harz gebundenen Inhibitor abgelöst. Nach Gelfiltration und Gefriertrocknung enthält die Substanz eine spezifische Aktivität von nur 1 100 mIU/mg. Wegen der geringen Ausbeute und des hohen Verlusts wird die beschriebene Methode nicht mehr verwendet.

8. Erste Gelfiltration und Gefriertrocknung

Nach Dialyse und Einengung wird die Substanz zur Entsalzung auf eine Sephadex G-50-Säule aufgetragen (4x150 cm). Die Elution erfolgt mit 5%igem Essigsäure-Puffer bei einer konstanten Elutionsgeschwindigkeit von 2,8 cm/h. Spätere Gelfiltrationen zur Entsalzung finden unter gleichen Bedingungen statt.

9. Vorversuch: Bestimmung der Bindungskapazität einzelner Ionenaustauscher

Unter Standardbedingungen (108) werden im Batch-Verfahren die Bindungskapazitäten einzelner Sephadex^R-Ionenaustauscher für das Untersuchungsmaterial bestimmt. Dabei werden für Kationen- und Anionenaustauscher die angegebenen Puffer verwendet.

Puffer	Ionenaustauscher Sephadex ^R		Adsorption des SSI-Materials, %
0,05 M Äthylendiamin, p_H 8	DEAE	-A-25	45
0,05 M TRA, p_H 8	QAE	-A-25	13
0,05 M Natriumacetat, p_H 5	SE	-C-25	89
0,05 M Natriumacetat, p_H 5	CM	-C-25	94

Die CM- und SE-Kationenaustauscher zeigen für SSI eine besonders gute Bindungskapazität.

10. Vorversuch: Ionenaustauschchromatographie

Eine präparative Auftrennung des Untersuchungsmaterials in einzelne Fraktionen durch Ionenaustausch-Säulen wird versucht. Dabei werden in einzelnen Versuchen das Ionenaustauscher-Material, die Elutionspuffer und die Steilheit ihrer Gradienten sowie auch die Säulengröße oder die aufgetragenen Substanzmengen verändert. Der Pufferdurchfluß beträgt stets 45 ml/h.

Die in 10 ml Anfangspuffer gelöste Substanz wird vorsichtig aufgetragen. Mit dem Anfangspuffer wird zunächst eine trübe, inhibitorisch aktive Fraktion eluiert. Sie enthält durchschnittlich 10% der insgesamt eingesetzten Inhibitor-Menge. Vermutlich besteht dieser Auslauf hauptsächlich aus Fremdeiweiß mit adsorbiertem Inhibitor. Die anschließende Elution erfolgt bei konstantem p_H mit linear steigenden Puffergradienten unterschiedlicher Steilheit für jeden Versuch. Die Kurve verläuft meist flach und kontinuierlich. Einzelne typische Fraktionen sind nicht zu erkennen. Das Beispiel eines typischen Versuchsergebnisses zeigt Abbildung 6. Die Versuchsbedingungen sind in der Legende angegeben. Die Fraktionen der Austausch-Säulen werden mit Hilfe eines Ultrafiltrationsgeräts "Diaflo" der Fa. Amicon (400 ml-Zelle, Membran UM-05 oder UM-2) eingeeengt, über Sephadex G-50 entsalzt und lyophilisiert. Die spezifische Aktivität schwankt je nach Versuch zwischen 600-900 mIU/mg.

Insgesamt ergibt sich bei keiner der durchgeführten Austauschchromatographien eine sinnvolle Auftrennung des Untersuchungsmaterials in einzelne Fraktionen inhibitorischer Aktivität.

Für die Isolierung des SSI sind die beschriebenen Ionenaustausch-Säulen mit einer maximal erzielten spezifischen Aktivität von 900 mIU/mg, ausgehend von 50-150 mIU/mg, und gleichzeitigem Verlust bis zu 40% daher wenig geeignet.

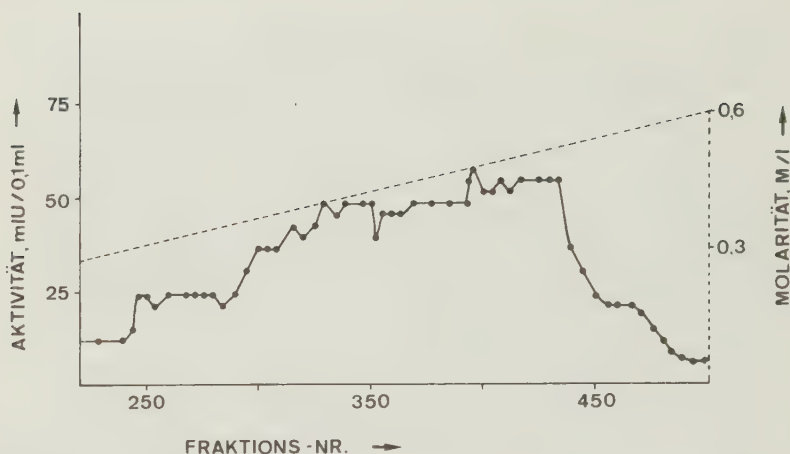


Abbildung 6: Inhibitorrelation von Sulfoäthyl-Sephadex C-25

Linke Ordinate : Inhibitoraktivität für Trypsin, mIU/0,1 ml

Rechte Ordinate: Molarität des Elutionspuffers, M/l

Abszisse : Fraktionsnummer der Elutionsvolumina

Bedingungen : 100 IU des Inhibitorpräparates werden in 10 ml Anfangspuffer gelöst und auf eine mit 0,05 M Ammoniumacetat-Puffer, p_H 5,4, äquilibrierte SE-Sephadex C-25-Säule (1,8x120 cm) aufgetragen. Nach dem Vorlauf einer trüben Lösung mit 5% Inhibitor wird bei einem linearen Gradienten von 0,05 M Ammoniumacetat auf 0,3 M Ammoniumacetat fast kein Inhibitor (unter 2%) eluiert. Erst nach Erhöhung des Gradienten von 0,3 M-0,6 M Ammoniumacetat erfolgt die Inhibitorablösung. Die Elutionsgeschwindigkeit dieser Probe liegt konstant bei 17,5 cm/h und das Fraktionsvolumen bei ca. 10 ml. Die Puffermengen betragen beim 1. Gradienten 1,2 l, beim 2. Gradienten ebenfalls 1,2 l.

Die spezifische Aktivität dieser Probe beträgt nach Entsalzung und Gefriertrocknung 895 mIU/mg bei 40% Verlust.

Tabelle 8: Übersicht über die einzelnen Versuchsanordnungen der Ionenaustauschchromatographie

Material Seph. C-25	Säulen- größe, cm	einge- setzte Menge, IU	Gesamt- verlust, %	Puffer, M	Gradient, M
CM	3,2x23	50	30	0,05 Na- Acetat, p_H^5	0,05NaCl
SE	3,2x23	100	18	0,1 Na- Acetat, p_H^5	0,2-0,5 0,5-1 NaCl
SE	3,2x23	50	20	0,05 Na- Acetat, p_H^5	0,2-0,5NaCl
SE	"	50	10	"	0,2-0,6NaCl
SE	"	100	15	"	0 -0,2 0,2-0,6NaCl
SE	"	50	15	"	0-0,15 NaCl 0,15-0,25 0,25-0,35
SE	1,8x120	100	10	0,05NH ₄ - Acetat, $p_H^{5,4}$	0-0,3 NaCl
SE	"	100	40	"	0,05-0,3 0,3 -0,6 NH ₄ -Acetat

11. Affinitätschromatographie über eine Trypsinharzsäule

Das in einer Säule (2,2 x 7 cm) mit Kühlmantel (Ultrakryomat TK Lauda, 0-4°C) gegossene Trypsinharz wird mit 0,4 M NaCl + 0,1 M TRA-Anfangspuffer (=a), p_H 7,8, äquilibriert und von allen unspezifisch gebundenen Substanzen freigewaschen (Die Proteinabsorption wird während des gesamten Versuchs von dem Uvicord-Durchflußphotometer bei 253 nm registriert.) Eine der Kapazität des Harzes entsprechende Menge Inhibitor (ca. 300 IU) wird in 10 ml Anfangspuffer (a) gelöst und abzentrifugiert. Der inhibitorhaltige Überstand wird auf die Säule aufgetragen und soll, da sich der Inhibitor-Enzymharz-Komplex rasch ausbildet, bei einer Elutionsgeschwindigkeit von etwa 8 cm/h einsickern. Anschließend wird mit dem Anfangspuffer (a) bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 16 cm/h solange gewaschen, bis die Proteinabsorptionskurve auf den Ausgangswert zurückgekehrt ist. Dann wird das Auslaufgefäß (A; s. Abb. 1) gewechselt und die Inhibitoraktivität des trüben Durchlaufs bestimmt. (Mehrere solcher Eluate werden vereinigt und nach Einengung auf 10 ml mit Hilfe der Ultrafiltration und Zentrifugation später erneut auf die Säule aufgetragen.)

Unter sonst gleichen Bedingungen wird nach diesem Gefäßwechsel (A) die Säule mit zehnfach verdünntem Anfangspuffer (b) 30 min gespült. Dadurch wird im folgenden Schritt eine raschere p_H -Änderung in der Harzsäule nach erneutem Pufferwechsel mit 0,4 M KCl/HCl Puffer, p_H 2,0, (c) ermöglicht.

Sobald das p_H der Elutionsflüssigkeit den Neutralpunkt erreicht hat, wird das Auffanggefäß (B) erneut gewechselt und das Eluat auf die normalerweise fehlende Inhibitoraktivität untersucht, dann verworfen.

Die Ablösung des Inhibitors erfolgt durch die Dissoziation des Inhibitor-Enzymharz-Komplexes im sauren Medium bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 10 cm/h. Je saurer

der Elutionspuffer ist und je schneller sich das saure p_H einstellt, desto konzentrierter wird der Inhibitor im Eluat erhalten.

Erreicht die Absorptionskurve nach der gesamten Elution des Inhibitors den Ausgangswert für den KCl/HCl Puffer (c), wird das Auslaufgefäß (C) gewechselt und die Inhibitor-Aktivität der klaren Elutionslösung gemessen.

Die Zeitdauer eines Versuchs beträgt durchschnittlich 8-12 h.

Nach Äquilibrierung mit 0,4 M NaCl + 0,1 M TRA-Puffer(a), p_H 7,8, über Stunden unter Uvicord-Kontrolle kann die Harzsaule erneut verwendet werden.

12. Zweite Gelfiltration und Gefriertrocknung

Der gereinigte Inhibitor wird sofort mit 2 M TRA-Puffer neutralisiert und durch Ultrafiltration eingeeengt. Je 400 IU in 50 ml werden auf eine Sephadex G-50 Säule (4 x 150 cm) aufgetragen; 5%iger Essigsäure-Puffer; konst. Elutionsgeschwindigkeit: 2,8 cm/h;

13. Molekulargewichtsbestimmung

Das mit 0,05 M TRA + 0,15 M Natriumchlorid-Puffer äquilibrierte Sephadex G-75 wird vorsichtig und möglichst kontinuierlich zu einer Säule (1,8 x 120 cm) gegossen und bei ständiger Wasserkühlung (3°C) ca. 24 h mit Puffer gewaschen. Eine konstante Elutionsgeschwindigkeit von 7,1 cm/h wird durch eine Saugpumpe gewährleistet.

0,5 mg Dextranblau(a) und je 3 mg der Eichsubstanzen Humanalbumin(b), Chymotrypsinogen A(c), Cytochrom C(d), Trasylol^R(g), zusammen mit 3 mg Glucose (s. Tabelle 5), in 1,5 ml des erwähnten Puffers gelöst, werden mit einer Spritze durch Unterschichtung vorsichtig auf die Säulenoberfläche aufgetragen (Eichkurve).

Die Proteinabsorption im Eluat wird mit dem Durchflußphotometer bei 253 nm bestimmt. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 4,5 ml gesammelt.

Bei der Molekulargewichtsbestimmung der Testsubstanz (Dextranblau(a), Humanalbumin(b), Chymotrypsinogen(c), SSI(f), Trasylol^R(g), in 1,5 ml Puffer gelöst) wird Cytochrom C(d) nicht auf die Säule aufgetragen, da sich in früheren Versuchen zeigte, daß sein Molekulargewicht dem der SSI-Probe ähnlich ist.

Die Inhibitoraktivität der Testsubstanz gegenüber Trypsin wird im üblichen Trypsin-Hemmtest bestimmt und ihr Maximum in die Proteinabsorptionskurve nachträglich eingezeichnet.

Die Bestimmung im sauren Milieu erfolgt unter Verwendung von 0,05 M Citratpuffer, p_H 2,2, nach entsprechender Äquilibrierung unter sonst gleichen Bedingungen. Anstelle von Cytochrom C wird Ribonuclease in der Eichkurve verwendet.

14. Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid

1 mg des isolierten SSI wird in 0,5 ml einer 0,5 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und die Inhibitorkonzentration bestimmt. Zu dieser Lösung werden anschließend 10 mg Maleinsäureanhydrid als feines Pulver gegeben und im Eisbad (0°C) 10 min geschüttelt (50). Nach 30 weiteren min Stehen und gelegentlichem Schütteln der Mischung bei Raumtemperatur wird eine p_H -Kontrolle durchgeführt, denn die Lösung darf nicht sauer sein. Die Hemmaktivität des Inhibitors wird sodann im Trypsintest bestimmt. Die Messung wird nach Zusatz weiterer 5 mg Maleinsäureanhydrid zur Lösung unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt.

15. Inaktivierung des Inhibitors durch das Butandion-Reagens

Das Butandion-(2,3)-Reagens wird nach der Vorschrift von Grossberg und Pressman hergestellt(113).

0,2 ml der Lösung des Polymaleoyl-SSI(Reaktionsansatz von 14.) werden mit 0,2 ml eines 1 M Natriumhydrogencarbonat/Natriumcarbonat-Puffers, p_H 8,6, und mit 0,2 ml des Butandion-(2,3)-Reagens versetzt(50).

Die gut vermischte Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den in Abb.5 angegebenen Zeitpunkten werden Proben entnommen und nach entsprechender Verdünnung ihre verbleibende Restaktivität gegenüber Trypsin und Plasmin gemessen. Jedoch wird auf eine Vorinkubation aufgrund der raschen Inaktivierungszeit verzichtet.

Unter Zusatz von je 0,2 ml Butandion-(2,3)-Reagens werden die Trypsin- und Plasminaktivitäten bestimmt und mit entsprechenden Reaktionsansätzen ohne Butandion-(2,3)-Reagens verglichen. Dabei zeigt sich, daß die vorgelegte Trypsin- bzw. Plasminaktivität durch das Butandion-(2,3)-Reagens im Test nicht beeinflusst wird.

16. Modifizierungsversuche

Zwei gleiche Mengen Inhibitor werden in 0,4 ml TRIS-HCl-Puffer(0,2 M, p_H 8,0) gelöst und die Ausgangsaktivität der Lösung bestimmt(330 mIU). Die Enzymsuspension von Carboxypeptidase B wird mit TRIS-HCl-Puffer(0,2 M, p_H 8,0) auf das zehnfache verdünnt und etwa 2 Gewichtsprozent des Enzyms(0,003 ml) zu der Inhibitorprobe gegeben. Die Inkubation der Test- und Vergleichsprobe erfolgt bei 25°C über 48 h.

17. Vorversuch: Verhalten des Plasmin-Inhibitor-Komplexes bei der Gelfiltration

Da sich bei der Chromatographie an Ionenaustausch-Säulen keine weiteren Charakteristika des isolierten Inhibitors ergeben, wird das Verhalten des Plasmin-Inhibitor-Komplexes mit Plasmin im Überschuß an einer Sephadex G-75-Säule untersucht.

Methodik: Die wassergekühlte Säule (1,8 x 120 cm) wird über 48 h mit basischem Puffer (0,05 M TRA + 0,15 M Natriumchlorid + 0,05 M Lysinhydrochlorid, p_H 8,9) äquilibriert.

Die Enzymaktivität der in 1,6 ml 0,0025 n Salzsäure gelösten 20 mg Plasmin und die Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin der in 0,8 ml basischem Puffer (s.o.) gelösten 2 mg SSI werden bestimmt, beide Lösungen zusammengegeben und nach guter Durchmischung und 10 min Inkubationszeit wird die Restaktivität von Plasmin (50%) bestimmt. Die Lösung wird nach Zusatz von 3 mg Glucose durch vorsichtiges Unterschichten auf die Säule aufgetragen. Die Elutionsgeschwindigkeit liegt konstant bei 9,5 cm/h; die Fraktionsvolumina betragen 6 ml/Glas; die Absorption des Eluats wird bei 253 nm registriert (Abb. 7).

Ergebnis und Diskussion: Die Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin und Plasmin der einzelnen Fraktionen wird im Trypsin- bzw. Plasmin-Hemmtest bestimmt und in die Kurve eingetragen. Auch nach Wiederholung des Versuchs unter gleichen Bedingungen ergeben sich die gleichen Kurven. Wird die Säule allein mit entsprechender Menge Plasmin besnickt, so gleicht die erhaltene Absorptionskurve im Charakter, also in Zahl und Art der Peaks, vollkommen der des Plasmin-Inhibitor-Komplexes.

Die Abbildung 7 läßt erkennen, daß stets zur gleichen Zeit in gleichen Elutionsvolumina insgesamt 3 große Maxima (Nr. 32, 38, 56) an Inhibitoraktivität sowohl gegenüber Trypsin als auch gegenüber Plasmin auftreten. Nach Fällung des Enzyms aus dem Enzym-Inhibitor-Komplex mit 6%iger Perchlorsäure im Volumenverhältnis 1:1 (5 min Inkubationszeit im Wasserbad bei 60°C), Neutralisation der Inhibitorlösung mit Kaliumcarbonat und Zentrifugation ergeben die von den 3 Peaks im Trypsin- und Plasmin-Hemmtest je gleich vorgelegten Inhibitormengen immer das gleiche Hemmverhältnis.

Dieses stets quantitative Verhalten der Inhibitor-Aktivität gegenüber Trypsin und Plasmin bei allen Fraktionen läßt den Schluß zu, daß es sich immer um den gleichen Inhibitor, also um einen einheitlichen Inhibitor handelt.

Das erste und das zweite Maximum (Nr. 32, 38) der Abb. 7 stellen wahrscheinlich ein Gesamtaktivitätsmaximum dar, das infolge nicht ganz einheitlichen Plasmins bzw. durch mögliche Verunreinigungen des Plasmins auseinander gezogen ist.

Jedenfalls ergibt die Gelfiltration von Plasmin allein den gleichen Kurvenverlauf. Der dritte große Peak (Nr. 56) und auch der kleine Vorpeak treten eventuell aus gleichem Grund auf. Wahrscheinlicher lassen sie sich aber durch die Reaktionsgeschwindigkeit oder Nachdissoziation nach dem Massenwirkungsgesetz und entsprechender Auftrennung an der Sephadex G-75-Säule erklären.

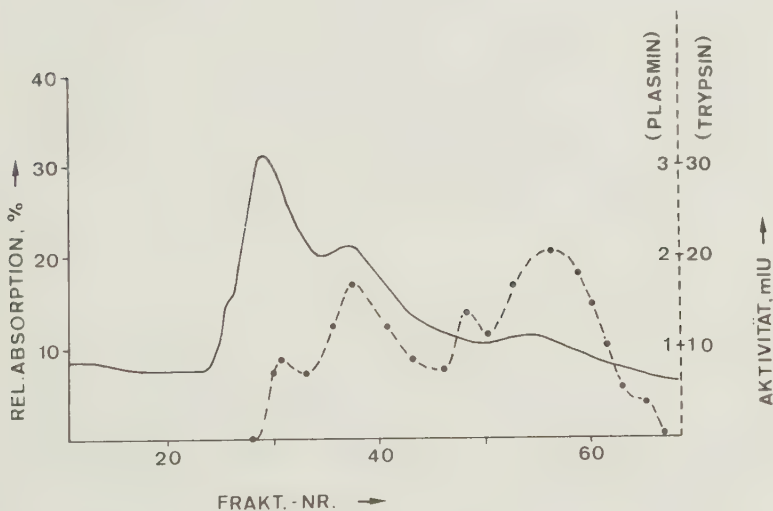
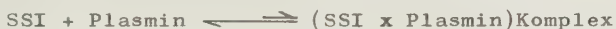


Abbildung 7: Verhalten des Plasmin-Inhibitor-Komplexes bei Gelfiltration

Linke Ordinate : rel. Absorption, %, bei 253 nm

Rechte Ordinate: Hemmaktivität der Fraktionen gegenüber Trypsin bzw. Plasmin, mIU

Abszisse : Fraktionsnummer

18. Versuche zur temporären Hemmung

Lösungen von mit TPCK-behandeltem Trypsin in 0,0025 M Salzsäure (60 mU/ml) und Schweinespermainhibitor in 0,2 M TRA-Puffer, p_H 7,8 (100 mIU/ml), werden im Volumenverhältnis 5:2 bei 25°C über 24 h inkubiert. Die Extinktion stets gleicher Proben (0,4 ml) wird in Zeitabständen im optischen Test bestimmt.

Auf Inkubation des Inhibitors mit weiteren proteolytischen Enzymen und Fällung des Enzyms durch 6%ige Perchlorsäure im Volumenverhältnis 1:1 bei 60°C nach gewisser Inkubationszeit und anschließender quantitativer Bestimmung der Restaktivität unter Standardbedingungen wird verzichtet, denn die vorliegenden Ergebnisse schließen eine typische temporäre Hemmung aus.

19. Aminosäure- und Aminozyuckerzusammensetzung

Jeweils 1 mg Protein werden in 2 ml 6 M Salzsäure und unter Vakuum in zugeschmolzenen Glasröhrchen 20-120 h bei 110°C hydrolysiert. Unter vermindertem Druck (11-15 mm Hg) wird die Säure am Rotationsverdampfer entfernt. Nach der Methode von Spackman, Stein und Moore (115) wird die Aminosäureanalyse der Hydrolysate mit einem Beckman-Aminosäureanalysator (Technicon Autoanalyzer) durchgeführt. Mit Hilfe eines Beckman-Integrators wird eine quantitative Auswertung erzielt.

Die Tryptophanbestimmung erfolgt aus den UV-Spektren (18);
Gerät: Leitz Unicam; Inhibitorkonzentration: 1 mg/ml;
Küvetten: Quarz, Schichtdicke 10 mm;
Die Messung erfolgte nach 70stündiger Inkubation mit 0,1 n Natronlauge.

20. Endgruppenbestimmung

Zur Bestimmung der N-terminalen Gruppe des Inhibitors werden 1-10 nMol nach der Methode von Gray(116) mit 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid(DNS-Cl) umgesetzt und in 6 n Salzsäure 15 h bei 110°C in zuge-schmolzenen Reagenzgläsern(8x70 mm) inkubiert. Durch zweidimensionale Chromatographie auf Polyamidschich-ten lassen sich die markierten Aminosäuren identifi-zieren(117,118).

Laufmittel: 1.) 1,5% Ameisensäure(118)

2.) Benzol/Essigsäure 9:1(118)

3.) Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig=
20:1:1(75)

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Einleitend wurde ein Überblick über Vorkommen und biochemische Eigenschaften von natürlichen Proteinase-Inhibitoren sowie über ihre physiologische Funktion und pharmakologische Bedeutung gegeben.

2. Zur Isolierung des Proteinase-Inhibitors aus Schweinesperma wurden folgende Schritte verwendet:

- a) Behandlung des Spermas mit verdünnter Perchlorsäure
- b) Adsorption des Inhibitors an Sulfoäthyl-Sephadex und Elution mit 5%iger Natriumchlorid-Lösung
- c) Entsalzung durch Gelfiltration, wobei Präparate mit einer spezifischen Aktivität von 50-150 mIU/mg (Trypsinhemmung) erhalten wurden
- d) Die weitere Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie. Der Inhibitor wurde dazu an einen wasserunlöslichen Trypsinharz-Komplex gebunden und die Begleitsubstanzen vom Harzkomplex ausgewaschen. Die Dissoziation des Komplexes erfolgte mit sauren Salzpufferlösungen von p_H 2,0. Die spezifische Aktivität des nach Entsalzung und Gefriertrocknung erhaltenen Präparates beträgt 2 IU/mg (Trypsinhemmung). Sie konnte bei zusätzlichen Reinigungsversuchen mit Ionenaustausch-Chromatographie nicht mehr gesteigert werden.

3. Der isolierte Inhibitor besitzt folgende Eigenschaften:

- a) Mit Trypsin und Plasmin bilden sich über p_H 6 äquimolare Enzym-Inhibitor-Komplexe, die in saurer Lösung in ihre einzelnen Komponenten dissoziieren.
Im reaktiven Zentrum des Inhibitors befindet sich ein Arginin-Rest (Aktivitätsverlust nach Umsetzung des

maleoylierten Inhibitors mit einem Argininreste spezifisch modifizierenden Butandion-(2,3)-Reagens). Nicht gehemmt werden Chymotrypsin, Pankreas-Kallikrein vom Schwein und Thrombin vom Rind.

Der Inhibitor zeigt permanentes Hemmverhalten gegenüber Trypsin.

- b) Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gel-filtration ergab einen Wert von 12000 (bei p_H 2,2) und 13 500 (bei p_H 7,0).
- c) Die Ergebnisse der Bausteinanalyse (Aminosäuren und Amino Zucker) finden sich in Tabelle 7 (S. 27). Der Inhibitor ist demnach im Gegensatz zu den meisten anderen niedermolekularen Inhibitoren ein Glykoprotein. Das Molekulargewicht berechnet sich aus der Zahl der Aminosäure- und Amino Zuckerwerte zu 11 607.
- d) Die Endgruppenbestimmung ergab einen Lysinrest.

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. E. Bauer, E. K. Frey, H. Kraut, F. Schultz, E. Werle, Naturwiss. 17, 672 (1929)
2. L. Camus, E. Gley, Compt. rend Soc. de biol. 49, 825 (1897)
3. K. Landsteiner, Centr. Bakteriolog. Parasitenk. 27, 357 (1900)
4. E. Bauer, E. K. Frey, H. Kraut, E. Werle, Naturwiss. 17, 672 (1929)
5. H. Kraut, E. K. Frey, E. Werle, Z. physiol. Chem. 192, 1 (1930)
6. H. Kraut, E. K. Frey, E. Werle, F. Schultz, Z. physiol. Chem. 230, 259 (1934)
7. M. Kunitz, J. H. Northrop, J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)
8. E. Werle, L. Maier, E. Ringelmann, Naturwissenschaften 39, 328 (1952)
9. E. Werle, W. Appel, Z. Naturforsch. 14b, 385 (1959)
10. E. Werle, Z. physiol. Chem. 338, 228 (1964)
11. I. Trautschold: Vortrag Gemeinsame Tagung der deutsch., franz. u. schweiz. Biochemiker, Zürich 1960
12. I. Trautschold, E. Werle, Z. physiol. Chem. 325, 48 (1961)
13. M. E. Webster a. I. V. Pierce, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 107, 186 (1961)
14. I. L. Prado, E. S. Prado, C. M. W. Brandi a. A. V. Katchburian, Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 186 (1963)

15. F.A.Anderer:Z.Naturforsch.20b,462(1965)
16. F.A.Anderer:Z.Naturforsch.20b,499(1965)
17. F.A.Anderer,S.Hörnle:J.Biol.Chem.241,1568(1966)
18. T.W.Goodwin,R.A.Mortau,J.Bioch.40,628(1946)
19. E.Werle,Z.physiol.Chem.338,228(1964)
20. R.Marx,P.Clemente,E.Werle,W.Appel,Blut 5,367(1959)
21. E.K.Frey,H.Kraut,E.Werle,Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren,Enke,Stuttgart(1968)
22. I.Trautschold,H.Fritz,E.Werle:In:E.G.Erdös,N.Back,F.Sicuteri:Hypotensive Peptides,221,Springer,New York (1966)
23. H.Fritz,M.Hutzel,I.Hüller,M.Wiedemann,M.Forell,Z.physiol.Chem.348,1575(1967)
24. H.Fritz,F.Woitinas,E.Werle,Z.physiol.Chem.345,168(1966)
25. H.Fritz,I.Trautschold,H.Haendle,E.Werle,Ann.N.Y. Acad.Sci.146,400(1968)
26. E.Werle in:Neue Asp.d.Tras.-Therapie,Bd.3,49(1969)
27. R.Vogel,I.Trautschold,E.Werle,Natürl.Proteinasen-Inhib.,Thieme Stuttgart(1966)
28. W.E.Ham,R.M.Sandstedt,J.Biol.Chem.154,505(1944)
29. P.E.Bowman,Proc.Soc.exp.Biol.Med.57,139(1944)

30. M.Kunitz, Science, 101, 668 (1945)
31. M.Kunitz, J.Gen.Physiol. 29, 149 (1946)
32. M.Kunitz, J.Gen.Physiol. 30, 291 (1947)
33. M.Kunitz, J.Gen.Physiol. 30, 311 (1947)
34. M.Kunitz, J.Gen.Physiol. 32, 241 (1948)
35. L.A.Kazal, D.S.Spicer, R.A.Brahinsky, J.Amer.chem.soc. 70, 3034 (1948)
36. H.Fritz, I.Trautschold, G.Hartwich, E.Werle, Fed.Europ. Biochem.Soc. IInd Meeting, Wien (1965)
37. H.Fritz, G.Hartwich, E.Werle, Z.physiol.Chem. 345, 150 (1966)
38. E.Müller, Dissertation, Med.Fak.Univ.München (1971)
39. H.Fritz, H.Schult.M.Neudecker, E.Werle, Angew.Chem. 78, 775 (1966)
40. H.Fritz, Habilitationsschrift, Med.Fak.Univ.München (1968)
41. V.Dlouha, P.Pospisilova, B.Meloun, F.Sorm, Coll.Czech. Chem.Comm. 30, 1705 (1966)
42. R.E.Feeney, R.G.Allison: "Evolutionary Biochemistry of Proteins", New York (1969)
43. R.E.Feeney, Biochemistry, Washington, 7, 2886 (1968)
44. A.M.Crestfield, S.Moore, W.H.Stein, J.Biol.Chem. 238, 622 (1963)

45. B.F.Erlanger, N.Kokowsky, Arch.Biochem.Biophys. 95, 271
(1961)
46. P.J.G.Buttler, J.I.Harris, B.S.Hartley, R.Lebermann,
Biochem.J. 103, 78 P (1967)
47. Dieselben ebenda 112, 679 (1969)
48. W.R.Finkenstadt, M.Laskowski, Jr., J.Biol.Chem. 240, PC
(1965)
49. W.R.Finkenstadt, M.Laskowski, Jr., J.Biol.Chem. 242, 771
(1967)
50. H.Fritz, E.Fink, M.Gebhardt, K.Hochstraßer, E.Werle,
Z.physiol.Chem. 350, 933 (1969)
51. J.Chauvet, R.Acher, Bull.Soc.Chim.Biol. 49, 985 (1967)
52. H.Fritz, E.Fink, R.Meister, G.Klein, Z.physiol.Chem. 351,
(1970)
53. H.Fritz, M.Gebhardt, E.Fink, W.Schramm, E.Werle, Z.physiol.
Chem. 350, 129 (1969)
54. H.Fritz, G.Hartwich, E.Werle, Z.physiol.Chem. 345, 150 (1966)
55. H.Fritz, K.Hochstraßer, E.Werle, Z.Analyt.Chem. 234,
452 (1968)
56. H.Fritz, K.-H.Oppitz, M.Gebhardt, I.Oppitz, E.Werle,
Z.physiol.Chem. 350, 91 (1969)
57. H.Fritz, I.Trautschold, E.Werle, Z.physiol.Chem. 342,
253 (1965)
58. H.Fritz, I.Trautschold, E.Werle, in: H.U.Bergmeyer: "Me-
thoden der enzymatischen Analyse", Weinheim 1970

59. H.Fritz, P.Pasquay, E.Werle: in Vorbereitung
60. L.J.Greene, J.J.DiCarlo, A.J.Sussman, D.C.Bartelt, J.
Biol.Chem. 243, 1804 (1967)
61. L.J.Greene, D.S.Fackre, M.Rigbi, Federat.Proc. 25, 3405
(1966)
62. L.J.Greene, M.Rigbi, D.S.Fackre, J.Biol.Chem. 241, 5610
(1966)
63. I.Trautschold, E.Werle, H.Haendle, H.Sebening, Z.physiol.
Chem. 332, 328 (1963)
64. I.Trautschold, E.Werle, H.Haendle, H.Sebening, in: Henning,
Heinkel und Schön: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und
Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1964)
65. H.Haendle, Dissertation, Med.Fak.Univ.München (1966)
66. H.Haendle, H.Fritz, I.Trautschold, E.Werle, Z.physiol.
Chem. 343, 185 (1965)
67. B.Kassell, M.Radicevic, M.Laskowski, Sr., Fed.Proc. 22,
529 (1963)
68. B.Kassell, M.Laskowski, Sr., Biochem.Biophys.Res.Comm.
17, 792 (1964)
69. B.Kassell, M.Radicevic, M.J.Ausfield, M.Laskowski, Sr.,
Biochem.Biophys.Res.Comm. 18, 255 (1965)
70. B.Kassell, M.Laskowski, Sr., Biochem.Biophys.Res.Comm.
20, 463 (1965)

71. K.Hochstraßer, E.Werle, W.Schramm, H.Fritz, S.Schwarz,
Z.physiol.Chem.350, 893(1969)
72. L.J.Greene, D.C.Bartelt, J.Biol.Chem.244, 2646(1969)
73. H.Tschesche, E.Wachter, S.Kupfer, K.Niedermeier, Z.
physiol.Chem.350, 1247(1969)
74. W.Fraeyel, R.Acher, Biochem.Biophys.Acta 154, 615(1968)
75. E.Fink, Dissertation, Naturwiss.Fak.Univ.München(1970)
76. M.Laskowski, M.Laskowski, Jr., Adv.Protein Chem.9, 203
(1954)
77. N.M.Green, E.Work, Biochem.J.54, 347(1953)
78. L.Gorini, L.Audrain, Biochem.Biophys.Acta10, 570(1953)
79. M.Laskowski, Sr., F.C.Wu, J.Biol.Chem.204, 797(1953)
80. H.Tschesche, H.Klein, Z.physiol.Chem.349, 1645(1968)
81. F.Astrup, U.Nissen, Nature 203, 255(1964)
82. K.Hochstraßer, E.Werle, Z.physiol.Chem.350, 249(1969)
83. M.Rigbi, L.J.Greene, J.Biol.Chem.243, 5457(1968)
84. K.Ozawa, M.Laskowski Jr., J.Biol.Chem.241, 3955(1966)
85. I.Trautschold, Habilitationsschrift, Med.Fak.Univ.
München(1966)

86. F.C. Wu, M. Laskowski, J. Biol. Chem. 213, 609 (1955)
87. G. Markus, W.C. Werkheiser, Fed. Proc. 21, 64 (1962)
88. E. Werle, L. Maier, Biochem. Z. 323, 279 (1952)
89. D.E. Bowman, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 86, 491 (1954)
90. I. Trautschold, E. Werle, H. Fritz in: Neue Asp. d. Tras.-Therapie, Bd. 1, 3
91. R. Haynes, R.E. Feeney, Biochemistry 7, 2547 (1968)
- 91a. R. Haynes, D.T. Osuga, R.E. Feeney, Biochemistry 6, 541 (1967)
92. M. Laskowski, Jr., M. Laskowski, J. Biol. Chem. 190, 564 (1951)
93. K. Walser, K. Ernst, Tierärztl. Wschr. 77, 393 (1964)
94. in: L. Heilmeyer: "Lehrbuch der speziellen pathologischen Physiologie", Stuttgart, 1968, Seite 119
95. L.J.D. Zaneveld, P.N. Srivastava, W.L. Williams, J. Reprod. Fert. 20, 337 (1969)
96. M.C. Pinsker, W.L. Williams, Arch. Biochem. Biophys. 122, 111 (1967)
97. R.P. Ambler in "Methods in Enzymology", Vol XI, New York, 1967, Seite 155, Methode (i)
98. F. Neumann, Naturw. Rdschau. 22, 371 (1969)

99. H.M.Dott, in J.T.Dingle, H.B.Fell: Lysosomes in Biology and Pathology, Bd. 1, 330 (1969), North-Holland Publ.Comp. Amsterdam
100. R.Stambaugh, J.Buckley, J.Reprod.Fert. 19, 423 (1969); Science Washington, 161, 585 (1968)
101. L.J.D.Zaneveld, W.L.Williams, Biology of Reprod. 2, (1970); s.dort weitere Literatur
102. H.Haendle, H.Ingrisch, E.Werle, Klin.Wschr. 48, 824 (1970)
103. R.Marx, Münch.med.Wschr. 108, 1267 (1966)
104. R.Marx in: Neue Asp.d.Tras.-Therapie, Bd. 2, Seite 89
105. F.K.Mörl, W.Heller in: Neue Asp.d.Tras.Therapie, Bd. 3, S. 161 u. 173
- 105a. W.Creutzfeldt ebenda S.89 bzw.
G.Schönbach ebenda S.103; s.dort weitere Literatur
106. M.Nagel, A.Meyer, J.Schier ebenda S.131
107. P.Matis in: Neue Asp.d.Tras.-Therapie, Bd. 2, S.19
108. Leitfaden zur Ionenaustausch-Chromatographie, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden (1970)
109. Enzyme Nomenclature, Recommendations (1964) of the International Union of Biochem. Elsevier Publ.Comp. Amsterdam 1965
110. W.Nagel, F.Willig, W.Peschke, F.H.Schmidt, Z.physiol. Chem. 340, 1 (1965)
111. J.Levin, M.Pecht, L.Goldstein, E.Katchalski, Biochem. J. 3, 1905 (1967)

112. T. Astrup, I. Sterndorff, Scand. J. clin. Lab. Invest. 9, 239 (1955)
113. A. L. Grossberg, D. Pressman, Biochemistry, Washington, 7, 272, (1968)
114. J. K. Inman, H. M. Dintzis, Biochemistry, Washington, 8, 4074 (1969)
115. D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
116. W. R. Gray in: "Methods in Enzymology", Vol. XI, New York, 1967, S. 139
117. V. Neuhoﬀ, F. van der Haar, E. Schlimme, M. Weise, Z. physiol. Chem. 350, 121 (1969)
118. K. R. Woods, K. -T. Wang, Biochim. Biophys. Acta 133, 369 (1967)
119. L. D. Zaneveld, K. L. Polakowski, R. T. Robertson, W. L. Williams in: H. Fritz u. H. Tschesche: Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors, Munich Nov. 1970, Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1971, Seite 236
120. E. Fink, F. Hammer, G. Müller-Bardorff, H. Fritz ebenda S. 225
121. H. Fritz, I. Hüller, M. Wiedemann, E. Werle, Z. physiol. Chem. 348, 405 (1967)
122. N. Heimbürger, H. Haupt, Clin. chim. Acta 12, 116 (1965)
123. H. Ingrisch, H. Haendle, E. Werle, Andrologie 2, 103, (1970)

LEBENS LAUF

Am 23.9.1945 wurde ich als dritter von vier Söhnen des Prof.Dr.Johannes Müller-Bardorff und seiner Ehefrau Sigrid,geb.Hanzig,in Burkhardtsdorf geboren.Seit 1952 besuchte ich die Schulen in Burkhardtsdorf,Jena,Hamburg, München und legte im Juli 1966 am Albert-Einstein-Gymnasium in München das Abitur ab.Seit November 1966 studiere ich an der Ludwigs-Maximilians-Universität München Humanmedizin,bestand im März 1969 die ärztliche Vorprüfung mit der Note "sehr gut" und im Dezember 1972 das Staatsexamen mit "sehr gut".Während meiner Medizinalassistentenzeit arbeite ich in Kliniken der Universität München.

